

**Titre:** Études des interactions entre les immunoglobulines G et leurs récepteurs Fc gamma afin d'évaluer le patron de glycosylation des anticorps  
**Title:**

**Auteur:** July Dorion-Thibaudeau  
**Author:**

**Date:** 2016

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Dorion-Thibaudeau, J. (2016). Études des interactions entre les immunoglobulines G et leurs récepteurs Fc gamma afin d'évaluer le patron de glycosylation des anticorps [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.  
**Citation:** <https://publications.polymtl.ca/2064/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/2064/>  
**PolyPublie URL:**

**Directeurs de recherche:** Gregory De Crescenzo, & Yves Durocher  
**Advisors:**

**Programme:** Génie chimique  
**Program:**

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉTUDES DES INTERACTIONS ENTRE LES IMMUNOGLOBULINES G ET  
LEURS RÉCEPTEURS FC GAMMA AFIN D'ÉVALUER LE PATRON DE  
GLYCOSYLATION DES ANTICORPS

JULY DORION-THIBAUDEAU

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR  
(GÉNIE CHIMIQUE)

FÉVRIER 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

ÉTUDES DES INTERACTIONS ENTRE LES IMMUNOGLOBULINES G ET LEURS  
RÉCEPTEURS FC GAMMA AFIN D'ÉVALUER LE PATRON DE GLYCOSYLATION DES  
ANTICORPS

présentée par : DORION-THIBAUDEAU July

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme HOEMANN Caroline, Ph. D., présidente

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. DUROCHER Yves, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. HENRY Olivier, Ph. D., membre

M. GAILLET Bruno, Ph. D., membre externe

## DÉDICACE

*À mon garçon, Olivier*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Gregory De Crescenzo qui a cru en moi et qui a toujours su trouver les bons mots pour m'encourager, même lors de moments « ordinaires ». Sa disponibilité, ses précieux conseils et son expertise m'ont été d'une grande aide, afin de réaliser ce projet de doctorat. Je tiens aussi à le remercier pour sa compréhension et son écoute qui m'ont particulièrement aidée ces derniers mois.

J'aimerais aussi remercier mon codirecteur Yves Durocher pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, mais aussi pour son soutien et son aide. Malgré son emploi du temps chargé, il a su me guider lors de mes grands questionnements sur la production des protéines. Son expertise au niveau de la culture cellulaire ainsi que la production et purification de protéines m'a été très utile et j'ai appris énormément.

Je tiens également à remercier différentes personnes qui sont intervenues de près ou de loin dans ce projet : Louis Bisson pour toute l'aide apportée afin d'amplifier mes cultures lorsque je travaillais à Poly; Brian Cass pour l'accès à l'AKTA lorsque celui de Poly était en panne; Gilles St-Laurent pour son aide et ses explications sur la biologie moléculaire; Christian Gervais et Denis Labbé pour leur gentillesse et leur aide; Roseanne Tom pour sa bonne humeur et son entrain; Sylvie Perret qui m'a enseigné les techniques de transfection transitoire.

Merci aussi à tous les étudiants, techniciens et associés de recherche avec qui j'ai travaillé ces cinq dernières années autant à Polytechnique qu'au CNRC. Un merci spécial à Nesrine qui est arrivée au labo au même moment que moi et avec qui j'ai développé une belle amitié. Merci aussi à Cédric, Alex, Inès, Massi, Pauline, Céline, Benoît, Samantha, Frédéric, Charles, Atefeh, Zahra, Élodie, Cécile, Éric et tous les autres qui m'ont permis de travailler dans une atmosphère agréable et amicale.

Finalement, j'aimerais remercier tous les membres de ma famille et belle-famille qui m'ont donné leur appui tout au long du doctorat. Un merci spécial pour quatre personnes, qui sont les plus importantes pour moi. Sans elles, je ne serais pas qui je suis aujourd'hui. Tout d'abord mes parents pour leur présence, leurs encouragements dans les moments plus difficiles et leur appui. Ces derniers mois ont été très exigeants et sans eux je n'y serais pas arrivée. Merci aussi à Jonathan

pour sa patience, son écoute, ses encouragements, son dévouement et pour son amour. Merci d'avoir *vortexé* mes tubes SPR et merci d'avoir lancé la balle à Pisco dans le stationnement du CNRC lorsque je devais démarrer des expériences les soirs et les fins de semaine. Grâce à ton support, j'ai réussi à atteindre mon objectif. Finalement, merci à mon garçon Olivier qui m'a donné la motivation nécessaire pour la fin de ce projet.

## RÉSUMÉ

Avec plusieurs brevets qui arriveront à échéance dans les prochaines années, un nombre grandissant de compagnies biopharmaceutiques a démarré des programmes de développement d'anticorps biosimilaires. Ces molécules thérapeutiques doivent répondre à plusieurs critères imposés par les agences de santé, comme un profil de glycosylation « adéquat ». Ainsi, plusieurs études se sont penchées sur les mécanismes cellulaires de la glycosylation afin de comprendre ce processus et de mieux le contrôler. C'est dans ce contexte qu'est né le réseau pancanadien MabNet auquel ce projet est rattaché. Cette thèse de doctorat s'inscrit dans la section analytique du réseau et a pour objectif de développer un essai cinétique et/ou thermodynamique fiable afin d'évaluer le patron de glycosylation de différents lots d'anticorps monoclonaux. Pour se faire, les interactions entre les domaines extracellulaires des récepteurs Fcγ et les anticorps monoclonaux ont été caractérisées en utilisant un biocapteur capable de les suivre en temps réel.

Dans le cadre de ce travail, nous avons tout d'abord produit et purifié les domaines extracellulaires des récepteurs FcγRI et FcγRIIIa comprenant une étiquette histidine par transfection transitoire dans les cellules de mammifère. Ces récepteurs sont utilisés dans un essai analytique de détection par résonance des plasmons de surface (SPR) afin d'évaluer les profils de glycosylation et l'état d'agrégation des anticorps monoclonaux. Ce travail a été publié dans le « *Journal of Immunological Methods* » en 2014. Ces travaux ont aussi été présentés lors de la conférence canadienne de génie chimique en 2012 en tant que présentateur invité (CSCHE, Vancouver) et lors de la conférence internationale « *Protein Expression in Animal Cell* » en 2013 (PEACe, Kananaskis). Plus particulièrement, nous nous sommes attardés à comparer l'immobilisation covalente par les amines des récepteurs à la surface du biocapteur et la capture orientée de ceux-ci grâce à un anticorps anti-histidine qui reconnaît l'étiquette histidine des récepteurs. Le greffage non orienté engendre des cinétiques plus complexes possiblement causées par la présence de plusieurs populations à la surface du biocapteur. Malgré l'amélioration de l'essai en utilisant une capture orientée du récepteur, les cinétiques obtenues n'étaient toujours pas décrites adéquatement par un modèle simple de Langmuir (1 :1), car l'association de l'anticorps avec le récepteur diminue l'affinité entre ce dernier et l'agent de capture. Ainsi, le récepteur se dissocie partiellement de l'agent de capture lors de l'injection de l'anticorps à évaluer. La capture via un anticorps anti-

histidine n'est pas idéale et une autre approche expérimentale devait être envisagée afin d'éliminer ces artéfacts. Cette étude initiale nous a aussi permis de mettre en évidence l'intérêt d'un test SPR pour détecter la présence d'agrégats dans les lots d'anticorps purifiés. Ceci est une alternative intéressante à une analyse par ultracentrifugation analytique puisqu'elle requiert moins de matériel et permet l'évaluation de la bioactivité simultanément.

Dans un second manuscrit publié en 2016 dans le « *Journal of Molecular Recognition* », une approche utilisant la forte affinité entre la biotine et la streptavidine pour capturer les récepteurs à la surface de la SPR a été exploitée. Ces travaux ont aussi été présentés lors de la conférence internationale *Cell Culture Engineering* en 2014 (CCE, Québec). Nous avons tout d'abord développé un protocole de biotinylation *in-cell* des récepteurs FcγRs afin d'éviter la réaction enzymatique *in vitro* et une étape de purification subséquente. La méthodologie consiste à co-transfecter des cellules de mammifère en utilisant deux plasmides codant l'un pour l'enzyme BirA (qui permet la biotinylation) et l'autre pour le récepteur ayant une séquence peptidique reconnue par l'enzyme (et qui sera biotinylée) en C-terminal. Comparativement aux techniques utilisées dans d'autres études, notre approche expérimentale de biotinylation *in-cell* par co-transfection permet d'ajuster les ratios enzyme-substrat afin d'optimiser les rendements finaux. Les résultats obtenus par ultracentrifugation analytique indiquent que la conformation du récepteur n'est pas influencée par la méthode développée et cette hypothèse est aussi validée par nos études SPR. Les quatre récepteurs biotinylés (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb et FcγRIIIa<sub>F158</sub>) ont été produits et capturés à la surface du biocapteur. Cette approche a permis de capturer les récepteurs de manière très stable par rapport à notre approche SPR basée sur l'utilisation d'un anticorps anti-histidine. Cependant, les interactions anticorps-récepteurs dévient toujours du modèle cinétique simple. Malgré cette déviation, nous avons pu évaluer de manière semi-quantitative les profils de glycosylation (analysés par spectrométrie de masse à l'Université du Manitoba) des anticorps, en enregistrant leurs cinétiques d'interaction avec les récepteurs FcγRI et FcγRIIIa.

Dans une troisième étude, en collaboration avec Céline Raymond (étudiante à l'Université de Montréal) qui sera soumise pour publication dans les prochaines semaines, notre test SPR a été utilisé afin d'évaluer les différents profils de glycosylation de notre anticorps modèle (TZM). L'anticorps cible l'antigène HER2 présent à la surface de certaines cellules cancéreuses, notamment lors du cancer du sein. En tout, huit TZM présentant différents patrons de glycosylation ont été analysés par notre approche SPR et il a été possible de corrélérer ces résultats à ceux obtenus



grâce à des tests cellulaires d'ADCC. Le test ADCC est un test de substitution, utilisant des cellules surexprimant le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub> ayant un gène rapporteur qui permet de corréler la fluorescence à l'interaction anticorps/récepteur. Ces résultats complémentaires viennent confirmer la validité et l'intérêt de la méthodologie que nous avons développée pour caractériser les interactions FcγR-immunoglobuline et prédire leur comportement.

Enfin, dans une quatrième étude soumise pour publication dans le « *Journal of Immunological Methods* », nous avons utilisé la même approche de capture (biotine-streptavidine) afin de caractériser la production d'un anticorps à même le surnageant d'une culture cellulaire. En un seul cycle d'injections, nous avons pu, grâce à notre approche, quantifier l'anticorps dans le surnageant et vérifier la capacité de ses portions Fc et Fab de se lier à leurs partenaires biologiques respectifs, à savoir, FcγRI et l'antigène.

A ce jour, aucune méthodologie fiable pour contrôler le processus de glycosylation des protéines n'a été développée. Les travaux présentés dans cette thèse permettent d'évaluer rapidement l'impact de la glycosylation sur la bioactivité des anticorps. L'essai analytique développé est d'un intérêt majeur, car il peut être mis en place pour assurer le suivi « en ligne » ou « hors ligne » de la qualité des protéines produites dans un procédé établi ou encore pour le développement d'un biosimilaire. De plus, cet essai pourrait être adapté et utilisé pour d'autres types de glycoprotéines.

## ABSTRACT

With several patents expiring within the next years, an increasing number of biopharmaceutical companies have started producing biosimilar antibodies. These therapeutic molecules must meet several criteria for health agencies, such as the obtainment of a “desirable” glycosylation pattern, which still represents a challenge for the industry in terms of control and characterization. It is in this context that the Canadian network MabNet, to which this project belongs, was born. This thesis is part of the analytical activities of the network and aims to develop a kinetic and/or reliable thermodynamic assay to evaluate the glycosylation profiles of different monoclonal antibodies. In this endeavour, the interactions between the extracellular domains of Fc $\gamma$  receptors and monoclonal antibodies have been explored using a surface plasmon resonance (SPR)- based biosensor.

In an initial study, we have produced and purified the extracellular domains of both his-tagged Fc $\gamma$ RI and Fc $\gamma$ RIIIa receptors by transient transfection in mammalian cells. These receptors were used in an analytical surface plasmon resonance (SPR)-based assay to evaluate the glycosylation patterns and the aggregation state of the monoclonal antibodies. This work was published in the “*Journal of Immunological Methods*” in 2014. These results have also been presented during the “*Canadian Conference of Chemical Engineering*” in 2012 as the Keynote speaker (CSChE, Vancouver) and during the international conference named “*Protein Expression in Animal Cell*” in 2013 (PEACe, Kananaskis). More precisely, the comparison between the covalent immobilization of the receptors and their oriented capture via an anti-Histidine antibody (which associates with the his-tag) was performed by SPR. The non-oriented grafting of the receptor ectodomains was shown to generate complex kinetics, more likely due to the presence of several receptor populations at the biosensor surface as a result of the non-oriented chemical immobilization. A receptor capture approach based on anti-Histidine antibody greatly improved the assay, however, the kinetic still deviated from the Langmuir model (1:1). This deviation was due to the fact that, upon antibody binding, the affinity of the receptor ectodomain for the capture anti-His antibody diminished, resulting in receptor dissociation from the surface of the SPR instrument. These results suggest that capturing receptors via an anti-Histidine antibody is not ideal: another capture strategy should be considered to eliminate this artefact. This initial study also allowed us to highlight that a SPR assay is an interesting alternative to analytical ultracentrifugation analysis for the detection of aggregates

in purified antibody batches as it requires less material for analysis and the bioactivity is being assessed at the same time.

In a second manuscript published in 2016 in the “*Journal of Molecular Recognition*”, an approach using the strong affinity between biotin and streptavidin to capture receptors onto the biosensor surface is described. These results have been presented during the international conference “*Cell Culture Engineering*” in 2014 (CCE, Quebec City). We first developed an *in-cell* FcγR biotinylation protocol which allows the elimination of the enzymatic *in vitro* biotinylation and an additional purification steps. The methodology is based on the co-transfection of mammalian cells with two plasmids encoding the BirA enzyme (responsible for biotinylation) and the receptor tagged with a specific peptide sequence (to be biotinylated) at its C-terminus. Compared to the techniques developed by other groups, our experimental *in-cell* biotinylation approach allows the fine tuning of the enzyme:substrate ratios in order to optimize the production yields. Investigations performed by analytical ultracentrifugation suggested that the conformation of the receptor we produced is not affected by tag/biotin addition, which was later confirmed by SPR. The four biotinylated receptors (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb and FcγRIIIa<sub>F158</sub>) were produced and tethered to streptavidin-derivatized SPR surfaces. This capture strategy significantly improved the quality of the kinetics we recorded when injecting antibodies (compared to the previous assay we designed with an anti-Histidine experimental approach). However, the antibody-receptor interactions still deviated from a simple kinetic model, more likely due to the presence of various glycoforms (analyzed by mass spectrometry at University of Manitoba) within the antibody lots we tested. Our assay was however applied to evaluate the glycosylation impact on the binding of monoclonal antibody preparations to the FcγRI and FcγRIIIa ectodomains.

In a third study to be submitted for publication in the coming weeks, in collaboration with Céline Raymond (student at Université de Montréal), our biotin-streptavidin capture strategy was applied to the characterization of different TZM antibody preparations. TZM targets HER2, an antigen present on the surface of some cancer cells, especially breast cancer. Eight TZM that harboured distinct glycosylation patterns were analyzed by SPR. Of salient interest, the SPR results with captured FcγRIIIa could be correlated to those generated in an ADCC assay performed with cells over-expressing the same receptor. Using a reporter gene, it was possible to correlate the fluorescence and the antibody/receptor binding. These additional results confirmed the validity and

relevance of the methodology we developed to characterize the antibody-Fc $\gamma$ R interactions in order to predict antibody behaviour in ADCC assays.

A fourth study submitted for publication to the “*Journal of Immunological Methods*” uses the same capture approach (biotin-streptavidin) to characterize the production of an antibody in the supernatant of a mammalian cell culture. In this study, we highlighted that, within a single cycle of injections, one may quantify the TZM in the supernatant and verify the antibody ability to bind its receptor and related antigen via its Fc and Fab portions, respectively.

To date, there is no trustable methodology developed to control the glycosylation process of proteins. The work presented in this thesis allows the assessment of the glycosylation impact on the bioactivity of antibodies. The analytical assay described is of great interest because it can be set up to monitor "online" or "offline" the quality of the protein produced in an established process or for the development of a biosimilar. Furthermore, this assay could be modified and used with other types of glycoproteins.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT.....	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XXII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Motivation.....	1
1.2 Problématique.....	2
1.3 Objectifs.....	4
1.4 Structure de la thèse.....	4
CHAPITRE 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
2.1 Anticorps.....	6
2.1.1 Structure.....	6
2.1.2 Immunoglobuline G.....	8
2.2 Récepteurs Fcγ.....	13
2.2.1 Structure des récepteurs Fcγ.....	13
2.2.2 Fonctions.....	17
2.3 Glycosylation.....	21
2.3.1 O-glycosylation & N-glycosylation.....	23
2.3.2 Étapes de la N-glycosylation.....	25

2.3.3	Glycosylation des anticorps.....	27
2.3.4	Influence de la glycosylation.....	27
2.3.5	Contrôle de la glycosylation.....	30
2.3.6	Analyse des profils de la glycosylation .....	36
2.4	Détection par résonance plasmonique de surface.....	38
2.4.1	Principe de la résonance plasmonique de surface et architecture des biocapteurs Biacore™ .....	39
2.4.2	Limitation par transfert de masse ou par cinétiques biologiques .....	46
2.4.3	Études sur l'interaction anticorps et les FcγRs.....	49
CHAPITRE 3	DÉMARCHE GÉNÉRALE DE L'ENSEMBLE DU PROJET ET ORGANISATION DU DOCUMENT.....	56
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 : DÉVELOPEMENT D'UN ESSAI BASÉ SUR LA DÉTECTION DE LA RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR ÉVALUER LE PATRON DE GLYCOSYLATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX EN UTILISANT LES DOMAINES EXTRACELLULAIRES DE CD16A ET CD64 .....	59
4.1	Présentation de l'article.....	59
4.2	Towards the Development of a Surface Plasmon Resonance Assay to Evaluate the Glycosylation Pattern of Monoclonal Antibodies Using the Extracellular domains of CD16a and CD64.....	60
4.2.1	Abstract.....	61
4.2.2	Introduction .....	61
4.2.3	Materials and Methods.....	63
4.2.4	Results.....	68
4.2.5	Discussion.....	78
4.2.6	Conclusion.....	81
4.2.7	Acknowledgements.....	81

4.2.8	References.....	82
<b>CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : BIOTINYLATION DU DOMAINE EXTRACELLULAIRE DES RÉCEPTEURS Fc<math>\gamma</math> PAR CO-TRANSFECTION DES CELLULES DE MAMMIFÈRE : APPLICATION POUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN ESSAI BASÉ SUR LA DÉTECTION DE LA RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE.....</b>		
<b>87</b>		
5.1	Présentation de l'article.....	87
5.2	Biotinylation of the Fc $\gamma$ receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay .....	88
5.2.1	Abstract.....	89
5.2.2	Introduction .....	90
5.2.3	Materials and Methods.....	92
5.2.4	Results.....	96
5.2.5	Discussion.....	108
5.2.6	Conclusion.....	112
5.2.7	Acknowledgements.....	112
5.2.8	References.....	114
<b>CHAPITRE 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES AU CHAPITRE PRÉCÉDENT : APPLICATION DE LA MÉTHODOLOGIE DÉVELOPPÉE.....</b>		
<b>118</b>		
<b>CHAPITRE 7 ARTICLE 3 : QUANTIFICATION ET ÉVALUATION SIMULTANÉE DE LA BIOACTIVITÉ DE L'ANTICORPS PRODUIT PAR LES CELLULES CHO – L'UTILISATION DE L'ECTODOMAINE DE Fc<math>\gamma</math>RI ET LE BIOACAPTEUR SPR.....</b>		
<b>122</b>		
7.1	Présentation de l'article.....	122
7.2	Quantification and simultaneous evaluation of the bioactivity of antibody produced in CHO cell culture - The use of the ectodomain of Fc $\gamma$ RI and surface plasmon resonance-based biosensor.....	123
7.2.1	Abstract.....	124

7.2.2	Introduction .....	125
7.2.3	Results and discussion .....	125
7.2.4	Conclusion .....	131
7.2.5	Acknowledgments .....	131
7.2.6	References .....	132
CHAPITRE 8 DISCUSSION GÉNÉRALE .....		133
8.1	Développement de la méthode SPR .....	134
8.2	Application de la méthodologie développée .....	137
CHAPITRE 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....		139
BIBLIOGRAPHIE .....		143



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Exemples d'IgG commercialisés (Elvin et al., 2013) .....	12
Tableau 2-2 : Récapitulatif des résultats SPR trouvés dans la littérature .....	53
Table 4-1 : Kinetics parameters related to the interactions of CD16a with TZM .....	72
Table 4-2 : Kinetics parameters for anti-His captured CD64 interacting with TZM .....	73
Table 5-1 : CD16a production: Final titers post-purification and biotinylation levels.....	100
Table 5-2 : Kinetics parameters related to the interactions of CD16a with reference TZM (Figure 4) .....	103
Table 5-3 : Kinetic and Thermodynamic parameters related to the interactions of CD32a, CD32b and CD64 with reference TZM (Figures 6 & 7) .....	104

## LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 : Schématisation des différents isotypes des immunoglobulines chez les mammifères	7
Figure 2-2: Schématisation d'une IgG.....	8
Figure 2-3 : Différentes classes de l'immunoglobuline G .....	9
Figure 2-4 : Formats d'anticorps thérapeutiques .....	11
Figure 2-5 : Schématisation des différents récepteurs Fcγ.....	14
Figure 2-6 : Schématisation de l'association des anticorps et antigènes aux récepteurs Fcγ.....	17
Figure 2-7: Deux modes d'interactions entre les anticorps ayant une affinité pour les antigènes de surface.....	18
Figure 2-8 : Modèles présentant l'interaction entre les récepteurs Fcγ et la portion Fc de l'anticorps. Adapté de Hanson and Barb (2015). <i>CD16a (A), CD32a (B) et CD64 (C)</i> .....	19
Figure 2-9 : Schématisation des mécanismes d'activation (A) et d'inhibition (B) liés aux récepteurs Fcγ.....	20
Figure 2-10 : Schématisation des étapes générales de l'ADCC (A) et de la phagocytose (B) .....	21
Figure 2-11 : Schématisation des principaux glycanes présents chez l'humain.....	22
Figure 2-12 : Principales structures de la O-glycosylation (A) et N-glycosylation (B) .....	24
Figure 2-13 : Schématisation des étapes de la N-glycosylation dans les cellules de mammifère. Inspiré de Georgen et al. (2011).....	26
Figure 2-14 : Principales structures des oligosaccharides attachés à l'immunoglobuline G .....	27
Figure 2-15 : Schématisation du site d'attachement des FcγRs à la portion Fc des IgG en présence d'acide sialique. Adapté de Pincetic et al. (2014). <i>La conformation de la portion Fc varie en fonction de la sialylation. L'absence de sialylation permet une configuration ouverte (A) alors que la présence d'acide sialique favorise une conformation fermée (B)</i> .....	29
Figure 2-16 : (A) Schématisation d'un système optique d'un instrument Biacore™ afin d'enregistrer les cinétiques d'interaction entre l'analyte (anticorps) et le ligand (récepteur jaune). (B)	

Changement de l'angle critique de la lumière incidente lorsque des molécules s'accumulent ou se dissocient de la surface. (C) Sensogramme montrant la réponse SPR en fonction du temps lors d'une expérience typique. ....	41
Figure 2-17 : Système micro-fluidique du système Biacore™ . Adapté de Biacore (1998).....	43
Figure 2-18 : Schématisation de l'immobilisation d'une protéine (bleu) via le groupement amine à la surface de dextran carboxyméthylé .....	44
Figure 2-19 : Schématisation de la capture d'un ligand biotinylé .....	45
Figure 2-20 : Représentation des conditions cinétiques et de la limitation par transfert de masse à la surface d'un instrument SPR .....	48
Figure 4-1 : Coomassie staining of non-reducing PAGE gels corresponding to the production of the extracellular portion of His-tagged CD16a (A) and CD64 (B). 75µL of sample corresponding to each purification step were loaded while 3µg (A) and 2.5µg (B) of both elution and PBS pool aliquots were loaded onto the non-reducing gel. ....	68
Figure 4-2 : Chromatograms corresponding to the SEC of FcγR extracellular portions (A) and monoclonal antibodies (B) using a Sephadex 200 resin. The chromatograms correspond to the injection of 10 mg of CD16a (solid line, panel A), 3 mg of CD64 (dashed line, panel A), 10 mg of TZM (solid line, panel B) and 5 mg of TZM-gal (dashed line, panel B). Fractions from 84 to 94 mL were pooled for CD16a, while fractions from 74 to 84 mL were pooled for CD64 (A). Fractions from 69 to 73 mL and from 69 to 74 mL were pooled for TZM and TZM-gal, respectively (B). ....	69
Figure 4-3 : Sensorgrams corresponding to the interactions between injected TZM (0; 1; 5; 10; 15; 30; 50; 100; 300; 500; 1000 nM, duplicate injections) and CD16a that had been covalently immobilized by amine coupling (A) or captured via its His-tag by a covalently bound anti-Histidine antibody (B). Double-referenced sensorgrams were globally fit using a 1:1 simple model (A2, B2 for corresponding residual plots) and heterogeneous ligand model (A3, B3 for corresponding residual plots). Global fits corresponding to the heterogeneous ligand model (A1) and the 1:1 simple model (B1) are shown as solid lines. ....	71
Figure 4-4 : Sensorgrams corresponding to the interactions between injected TZM (0; 0.1; 0.3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 nM), and CD164 that had been captured via its His-tag by a covalently	

bound anti-Histidine antibody (A). The kinetics were fitted using the Langmuir model (B).  
 ..... 73

Figure 4-5 : Effect of TZM aggregation on its kinetics of dissociation from CD16a. Sensorgrams corresponding to the injection of 1000 nM monomeric TZM in the presence of 0 – 50 % of HMW and VHMW aggregates over captured CD16a are shown in Panels (A) and (B), respectively (The two bottom curves on each panel correspond to aggregate-free TZM injections). Remaining amount of TZM at 170 s, time at which aggregate-free TZM was observed to be completely eluted, is shown in Panel C. For low percentage of aggregated TZM, a close-up of Panel C is given (D). Any response above the dash line at 3 RU is considered to be different from the non-aggregated pool of TZM (D). ..... 75

Figure 4-6 : MALDI-TOF/TOF mass spectra recorded in the reflectron positive ion mode for N-glycan pools obtained from MAb: TZM (A) and TZM-gal (B). Glycans are labeled with PHN (+90.05) and detected as MNa<sup>+</sup>. Proposed structures are deduced from MS/MS fragmentation patterns and from the data obtained before and after exoglycosidase digestion with the  $\beta$ -galactosidase. Symbols: red triangle (fucose), blue square (N-acetyl-glucosamine), green circle (mannose) and yellow circle (galactose). ..... 77

Figure 4-7 : Sensorgrams corresponding to the injection of TZM (black), TZM NG (light gray), TZM-gal (dark gray) at 1000 nM over CD16a using the anti-Histidine capture method, in duplicates. .... 78

Figure 5-1 : Western blots of supernatants corresponding to CD16a (A), CD32a (B), CD32b (B) and CD64 (C) using 0 – 3 % (w/w) BirA plasmid, probed with either anti-histidine (1) for total receptor production or streptavidin (2) for biotinylation level. .... 98

Figure 5-2 : Coomassie staining of non-reducing SDS-PAGE gels corresponding to the production of biotinylated CD16a, CD32a, CD32b and CD64 ectodomains. 18  $\mu$ L of sample corresponding to each purification step were loaded while 2 - 3  $\mu$ g of proteins from the elution, PBS wash and SEC pool aliquots were loaded onto the gel. .... 99

Figure 5-3 : Sedimentation coefficient distribution of *in-cell* (black), *in vitro* (gray) and biotin-free (dashed gray) CD16a at 50 000 rpm. .... 101

- Figure 5-4 : Sensorgrams corresponding to the interactions between injected control TZM (10, 30, 100, 300, 500, 1000 nM, duplicate injections) and biotinylated CD16a that had been captured by streptavidin. Double-referenced sensorgrams were globally fit (corresponding residuals shown in the bottom panel) and a steady-state analysis was also performed (inset) both assuming a 1:1 simple model interaction. Note that in the inset, the vertical dashed line corresponds to the  $K_D$  value derived from the steady-state analysis. .... 102
- Figure 5-5 : Sensorgrams corresponding to the injection of TZM at 1000 nM over *in-cell* (black) and *in vitro* (gray) CD16a, both in duplicates. .... 103
- Figure 5-6 : Sensorgrams corresponding to the interactions between reference TZM (10, 30, 100, 300, 500, 1000 nM, duplicate injections) and biotinylated CD64 captured by streptavidin. Double-referenced sensorgrams were globally fit assuming 1:1 simple model (corresponding residuals shown in the bottom panel). .... 104
- Figure 5-7 : Sensorgrams corresponding to the interactions between reference TZM (10, 30, 100, 300, 500, 1000 nM, duplicate injections) and biotinylated CD32a (A) or CD32b (B) captured by streptavidin. Double-referenced sensorgrams were analyzed by a steady-state analysis (see insets). Note that in the insets, the vertical dashed lines correspond to the  $K_D$  values derived from the steady-state analyses. .... 105
- Figure 5-8 : Sensorgrams corresponding to the injection of reference TZM (black), TZM-NG (light gray), TZM-gal (dark gray) at 1000 nM over CD16a (A) or at 300 nM over CD64 (B), in duplicates. .... 107
- Figure 5-9 : Normalized sensorgrams corresponding to the injection of 1000 nM of control TZM over CD16a (Panel A) or CD64 (Panel B) that had been captured via a His-tag protocol (Dorion-Thibaudet et al., 2014) (gray curves) or via biotin-streptavidin interactions (black curves, this study). .... 108
- Figure 6-1 : Sensogrammes normalisés présentant l'association de 8 IgGs ayant différents patrons de glycosylation avec le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub> ..... 119
- Figure 6-2 : Résultats d'ADCC avec le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub> et 8 IgGs présentant différents patrons de glycosylation ..... 120

Figure 7-1 : Control-corrected sensorgrams corresponding to duplicate injections of CHO cell culture supernatants (dilution 1/50 in HBS-P 1×) over 1 600 RU of biotinylated FcγRIIIa (A), 2 000 RU of biotinylated FcγRIIa (B), 2 000 RU of biotinylated FcγRIIb (C) and 1 400 RU of biotinylated FcγRI (D) that had been captured at the biosensor surface using the Biotin CAPture kit as described in (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). Supernatants were collected from 24 hpt to 144 hpt (every 12h), centrifuged ( $10\,000 \times g$ , 5 min) and filtered (0.2μm), prior injection on the biosensor surfaces. .... 126

Figure 7-2 : Off-line monitoring by SPR of a CHO cell culture to quantify TZM production and confirm TZM bioactivity. (A) Calibration curve generated by extracting the initial reaction rate of control-corrected sensorgrams corresponding to purified Mab injections on captured FcγRI (dilution 1/20, n=4). (B) Sensorgrams corresponding to the injection of each cell culture supernatant (1), buffer injection (2) and then injections of increasing concentrations of TZM antigen at 50 μL/min, HER2 (eBioscience, USA), at 1 nM (3), 5 nM (4), 10 nM (5) and 30 nM (6). (C) Off-line quantification of active TZM within cell culture supernatants by SPR using the calibration curve shown in A (black square, n=4), by HPLC with a protein-A column (dark gray circle, n=3, POROS® A20 column, Invitrogen, NY, Part# 2-1001-00) or by SPR using the CFCA method (light gray circles, n=3). (D) Correlation between active TZM concentrations determined by SPR with the calibration method vs. CFCA method..... 129

Figure 7-3 : Normalized sensorgrams corresponding to the interactions between HER2 and surface-captured TZM. Increasing concentrations of HER2 were injected (1, 5, 10, 30 nM, 1 min at 50 μL/min.) over captured TZM (resulting from supernatant injections at 1/50 (A) and 1/20 (B) dilutions in HBS-P buffer, followed by a 3-min buffer injection to stabilize TZM capture). All responses were normalized at the end of the buffer injection following the last HER2 injection. Supernatants corresponding to 24 and 36 hpt are shown in light gray while those corresponding to 48 up to 144 hpt are shown in black. .... 130

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACN	Acétonitrile
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps
Asn	Asparagine
AUC	Ultracentrifugation analytique
BAP	Peptide accepteur de biotine
CDC	Cytotoxicité dépendant du complément
CHO	Cellule ovarienne de hamster
Da	Dalton
dpt	Journée post-transfection
EBNA1	Epstein–Barr nuclear antigen 1
Fab	Fragment se liant à l’antigène de l’immunoglobuline
Fc	Fragment cristallisable de l’immunoglobuline
FcγR	Récepteur Fcγ
FDA	Secrétariat américain aux produits alimentaires et pharmaceutiques
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-actéylgalactosamine
GF	Filtration sur gel
GFP	Protéine verte fluorescente
GlcNAc	N-acetylglucosamine
HEK	Cellule rénale d’embryon humain
His	Histidine

HMW	Haut poids moléculaire
hpt	Heure post-transfection
Ig	Immunoglobuline
IgG	Immunoglobuline de type G
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition</i>
$k_a$	Constante cinétique d'association
$k_d$	Constante cinétique de dissociation
$K_D$	Constante thermodynamique de dissociation
Mab/AcM	Anticorps monoclonal
Man	Mannose
MW	Poids moléculaire
NeuAc	Acide neuraminique
NG	Non glycosylé
PEI	Polyéthylénimine
PHN	Phénylhydrazine
PNGaseF	Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy) asparagine amidase
Pro	Proline
$R_{\max}$	Réponse maximale
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RT	Température pièce
RU	Unité de résonance
SDS-PAGE	Électrophorèse de polyacrylamide en présence de sulfate de sodium dodécylque
SEC	Chromatographie d'exclusion par la taille



Ser	Sérine
SIA	Acide sialique
SPR	Résonance plasmonique de surface
TFA	Acide trifluoroacétique
Thr	Thréonine
TN1	Tryptone N1
TZM	Trastuzumab
VHMW	Très haut poids moléculaire
VPA	Acide valporique

## Chapitre 1 INTRODUCTION

### 1.1 Motivation

Les anticorps sont des glycoprotéines ayant une grande importance chez l'homme. En effet, elles sont les molécules clés du système immunitaire puisqu'elles permettent de détecter les antigènes de manière hautement spécifique (Shire et al., 2010). Cette reconnaissance spécifique est aussi mise à profit au laboratoire pour le développement de techniques de détection comme le test ELISA ou encore le transfert de type western (Western Blots) (Engvall and Perlmann, 1971; Mahmood and Yang, 2012). Enfin, dans le domaine de la médecine, les anticorps peuvent être injectés à un patient afin de cibler un type cellulaire ou encore un agent pathogène à éliminer (Li and Zhu, 2010). Ces anticorps sont dits « thérapeutiques » et représentent la majorité des molécules qui sont produites de nos jours par l'industrie biopharmaceutique (Al-Rubeai, 2011). La valeur globale du marché des anticorps monoclonaux (AcM) est d'environ 20 milliards de dollars par année (Liu, 2014). Près de 50 AcMs sont approuvés aux États-Unis et en Europe pour le traitement de maladies chez l'humain, comme le cancer, les maladies inflammatoires chroniques, les maladies infectieuses ainsi que les maladies cardiovasculaires (Ecker et al., 2015; Li and Zhu, 2010). Plusieurs autres sont présentement en phase clinique I et II et une vingtaine de AcMs et dérivés sont attendus sur le marché d'ici 2020 (Ecker et al., 2015).

Les anticorps thérapeutiques sont développés et produits depuis plus de 15 ans et plusieurs succès commerciaux ont vu le jour comme l'Herceptin®, le Rituxan®, l'Avastin® et le Remicade® pour ne nommer que ceux-ci. Plusieurs brevets arriveront à échéance dans les prochaines années, ce qui crée un engouement au sein de l'industrie biopharmaceutique à produire des molécules qui seront similaires d'un point de vue biologique (biosimilaires). On peut comparer ces biosimilaires aux médicaments génériques de l'industrie pharmaceutique. Cependant, les molécules biologiques sont similaires (non identiques), car elles ne sont pas produites à partir de la même cellule hôte que le médicament original. Toutefois, ces nouveaux médicaments doivent être équivalents en ce qui concerne l'efficacité, la qualité et la sécurité. Un élément particulier des anticorps influence ces trois critères : leur profil de glycosylation. En effet, la glycosylation a un impact majeur sur les AcMs puisqu'elle affecte leur demi-vie, leur conformation, leur pouvoir immunogène ainsi que les

fonctions effectrices. Ces dernières années, plusieurs groupes de recherches se sont intéressés à la glycosylation afin de mieux comprendre comment elle influence le mécanisme d'action de l'anticorps sur les cellules effectrices et donc d'optimiser son efficacité comme molécule thérapeutique. Plusieurs facteurs peuvent influencer le profil de glycosylation des protéines, comme les conditions de culture (pH, nutriment, oxygène, température, etc.), les enzymes et les substrats des réactions de la glycosylation (les détails seront discutés dans la revue de la littérature). Parmi les récepteurs présents à la surface des cellules immunitaires, on retrouve les récepteurs Fc qui s'associent à certains AcMs (les détails seront discutés dans la revue de la littérature). Les recherches provenant des milieux académique, médical et industriel ont démontré que ces récepteurs sont le point central, ou du moins participent grandement, à une grande variété de fonctions immunitaires dites « désirables » et « indésirables ». Parmi ces fonctions, on note les rôles de protection ou de modulation des AcMs dans l'immunité chez un patient sain ou encore les actions de destruction des anticorps chez un patient présentant une pathologie (ex. maladie inflammatoire). L'industrie biopharmaceutique tente de comprendre et d'utiliser à bon escient les fonctions de modulation de la réponse immunitaire et de destruction pour le développement d'anticorps thérapeutiques interagissant de façon souhaitable avec les récepteurs Fc.

Tous ces efforts sont essentiels pour l'amélioration des AcMs thérapeutiques, plus précisément la production d'anticorps ayant un profil de glycosylation contrôlé afin d'accroître leur effet thérapeutique. Il y a donc actuellement un intérêt grandissant pour l'industrie à développer des méthodes analytiques fiables afin d'évaluer si les anticorps produits sont correctement glycosylés, efficaces et de qualité.

## 1.2 Problématique

Les anticorps monoclonaux produits dans les cellules de mammifère subissent différentes modifications post-traductionnelles. Celles-ci influenceront, entre autres, la structure et la fonction de la macromolécule produite (Gabijs, 2009). Parmi ces modifications, le processus complexe de glycosylation est responsable d'une hétérogénéité de la population des AcMs produits. Cette hétérogénéité peut être subdivisée en deux catégories: la macrohétérogénéité qui consiste en la

présence ou non de glycosylation sur un site donné et la microhétérogénéité qui correspond au type et à l'ordre des oligosaccharides ajoutés à la chaîne polysaccharidique (Butler, 2006). Ces hétérogénéités complexifient donc le produit obtenu. De plus, au sein d'un même lot de production, les anticorps n'auront pas tous le même patron de glycosylation (Butler and Spearman, 2014). Or, il a été démontré que les fonctions d'ordres physico-chimiques et biologiques des glycoprotéines produites sont directement influencées par cette modification post-traductionnelle (Butler, 2006). Par exemple, la présence d'acide sialique peut engendrer un changement subtil de conformation de l'anticorps, modifiant ainsi son efficacité (Sondermann et al., 2013). Par ailleurs, plusieurs études ont révélé que la glycosylation des anticorps avait une influence directe sur l'interaction avec les récepteurs Fc $\gamma$  qui s'associent à la portion Fc des immunoglobulines G (IgG) (Jefferis, 1993; Radaev and Sun, 2001; Zeck et al., 2011). Ces derniers jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire puisqu'ils permettent de détruire et d'éliminer les antigènes et pathogènes présents (Forthal, 2014). Dans un contexte biopharmaceutique, il est donc souhaitable de produire des anticorps thérapeutiques ayant un patron de glycosylation homogène afin d'obtenir une réponse immunitaire adéquate chez le patient. Par conséquent, la glycosylation demeure un aspect important du médicament biologique et c'est pourquoi elle est étudiée par plusieurs groupes de recherche. Présentement en industrie, il n'y a pas de méthode établie pour contrôler la qualité du patron de glycosylation des protéines produites (Hossler et al., 2009; Ivarsson et al., 2014). De ce fait, plusieurs laboratoires notamment au sein du réseau CRSNG « *Strategic Network for the Production of Single-type Glycoform Monoclonal Antibodies (MabNet)* » travaillent sur cette problématique tant au niveau de la culture cellulaire qu'au niveau de l'analyse et de la purification de ces glycoprotéines. En plus de ne pas avoir de méthodologie pour contrôler la glycosylation, aucune technique fiable n'a été développée à ce jour afin d'évaluer rapidement l'efficacité de l'anticorps à se lier aux récepteurs Fc $\gamma$ . Plusieurs résultats se contredisent dans la littérature et il est difficile d'en tirer des conclusions claires puisque les chercheurs n'étudient pas les mêmes molécules et emploient différentes techniques qui peuvent présenter certains artefacts.

Ce projet de doctorat, en collaboration avec le MabNet, est axé sur l'aspect analytique relatif aux anticorps monoclonaux produits au sein de ce réseau canadien. Il a pour but d'évaluer le patron de glycosylation des anticorps en analysant l'interaction de ces derniers avec les récepteurs Fc $\gamma$ . En

effet, grâce au développement d'un essai SPR fiable, il sera possible d'évaluer rapidement l'impact de la glycosylation sur les cinétiques d'interactions anticorps/récepteur Fc $\gamma$ .

### 1.3 Objectifs

Le défi de cette thèse est de développer un essai cinétique et/ou thermodynamique afin d'évaluer le patron de glycosylation de différents lots d'anticorps monoclonaux. Pour se faire, il est proposé de caractériser les interactions entre les domaines extracellulaires des récepteurs Fc $\gamma$  et les anticorps monoclonaux en utilisant un biocapteur dont le principe de détection est basé sur la résonance des plasmons de surface (*Surface Plasmon Resonance* - SPR). Cet objectif général repose sur l'hypothèse que les domaines extracellulaires des récepteurs Fc $\gamma$ , lorsqu'immobilisés à la surface d'un biocapteur, imiteront ceux présents à la surface cellulaire et interagiront avec les différentes formes glycosylées des anticorps selon différentes cinétiques. Pour atteindre cet objectif général, des objectifs spécifiques ont été établis :

1. Produire et purifier les domaines extracellulaires des récepteurs Fc $\gamma$  CD16a, CD32a, CD32b et CD64.
2. Développer et valider un essai SPR permettant de mesurer les interactions entre les anticorps et les récepteurs Fc $\gamma$ .
3. Corréler le patron de glycosylation de plusieurs lots d'anticorps à leurs interactions avec les Fc $\gamma$ Rs.
4. Développer et valider un essai permettant de quantifier et d'évaluer le profil de glycosylation de l'anticorps directement dans le milieu de culture.

### 1.4 Structure de la thèse

Cette thèse est organisée en huit chapitres. Une revue critique de la littérature sur le sujet, décrivant notamment les anticorps, les récepteurs Fc $\gamma$ , le processus de glycosylation des protéines ainsi que le biocapteur de type SPR sera présentée au chapitre 2. Le chapitre 3 présente l'organisation du document. Les chapitres 4, 5 et 7 correspondent à des articles scientifiques déjà

publiés ou soumis dans le cadre de cette thèse de doctorat. Le premier article rapporte la production et la purification des domaines extracellulaires des récepteurs CD16a et CD64 ayant une étiquette histidine. Ces derniers sont ensuite utilisés afin de développer un essai utilisant la SPR pour caractériser les interactions avec des anticorps présentant différents patrons de glycosylation mais aussi afin de détecter la présence d'agrégats dans le lot d'anticorps. Le deuxième article décrit un processus de biotinylation *in-cell* des quatre récepteurs Fcγ par co-transfection transitoire dans les cellules de mammifère. Cet article souligne les bénéfices de cette approche qui requiert moins d'étapes de purification et permet d'obtenir un niveau de biotinylation et un rendement de production similaires à une biotinylation standard effectuée *in vitro*. Les récepteurs biotinylés ensuite capturés par la streptavidine présente à la surface du biocapteur SPR, permettent d'analyser les interactions avec des anticorps présentant différents profils de glycosylation. Dans le chapitre 6, une application directe de la méthodologie SPR développée est présentée en analysant huit anticorps présentant différents profils de glycosylation. Ces résultats ont été obtenus grâce à une collaboration menée au sein du réseau MabNet. Le troisième et dernier article rapporte l'utilisation du récepteur haute affinité, CD64, afin de quantifier les anticorps présents dans le surnageant de culture sans aucune purification. Cela est possible en employant la méthodologie de capture du récepteur sur la surface du biocapteur SPR telle que présentée au chapitre précédent. De plus, il est démontré dans ce chapitre qu'il est possible de quantifier l'anticorps présent (via le domaine Fc) mais aussi de vérifier son interaction avec son antigène. Finalement, les chapitres 8 et 9 présentent une discussion, la conclusion et les recommandations liées à ce travail.

## **Chapitre 2 REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE**

La revue de la littérature est divisée en quatre sections distinctes. La première présente les anticorps et les différents isotypes présents chez l'humain. Une attention particulière sera portée à l'immunoglobuline G (IgG) qui est étudiée dans le cadre de ce doctorat. Dans la deuxième section, il sera question des récepteurs Fc, ayant une affinité pour les IgGs. La description de chacun de ces récepteurs ainsi que sa(ses) fonction(s) seront expliquées. Ces récepteurs permettent l'activation des cellules effectrices du système immunitaire et leur mode d'action suite à l'association avec les IgGs sera décrit à la fin de ce volet. La troisième section présente le processus de glycosylation et explique comment cette modification post-traductionnelle influence l'interaction anticorps-récepteur. Une attention particulière est portée sur le contrôle de ce processus, puisqu'il est toujours mal compris mais essentiel lors du développement de nouveaux anticorps thérapeutiques. Finalement, la quatrième section se veut être une revue des études des interactions entre anticorps et récepteurs Fc, effectuées par biocapteur basé sur la résonance des plasmons de surface.

### **2.1 Anticorps**

Les anticorps jouent un rôle essentiel pour le système immunitaire adaptatif. Ce dernier est activé lorsqu'un agent infectieux est reconnu par le système immunitaire inné. Plus précisément, la réponse adaptative permet une amplification de la réponse immunitaire en produisant des anticorps spécifiques à l'antigène et permet une « réponse mémoire » si l'organisme est confronté de nouveau au même antigène (Male and Roitt, 2007; Paul, 2012). Ce mécanisme de défense hautement spécifique justifie l'importance accordée aux immunoglobulines (Igs) en recherche afin de mieux comprendre le système immunitaire, mais aussi pour développer de nouvelles alternatives thérapeutiques (Shuptrine et al., 2012).

#### **2.1.1 Structure**

La superfamille des immunoglobulines comprend différentes glycoprotéines impliquées dans la reconnaissance, l'adhésion et la liaison aux cellules (Paul, 2012). Parmi ces Igs, on retrouve les anticorps qui sont présents sous différents isotypes chez les mammifères (Figure 2-1). Les classes

d'immunoglobulines (IgA, IgD, IgG, IgE, IgM) diffèrent par le type de chaînes lourdes présentes sur la glycoprotéine, et ce, indépendamment de la chaîne légère (Vidarsson et al., 2014). On retrouve les chaînes alpha ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) ainsi que mu ( $\mu$ ) (Abbas and Lichtman, 2007). De ce fait, les fonctions biologiques, physiques ainsi que les fonctions effectrices varient dépendamment de la chaîne lourde.

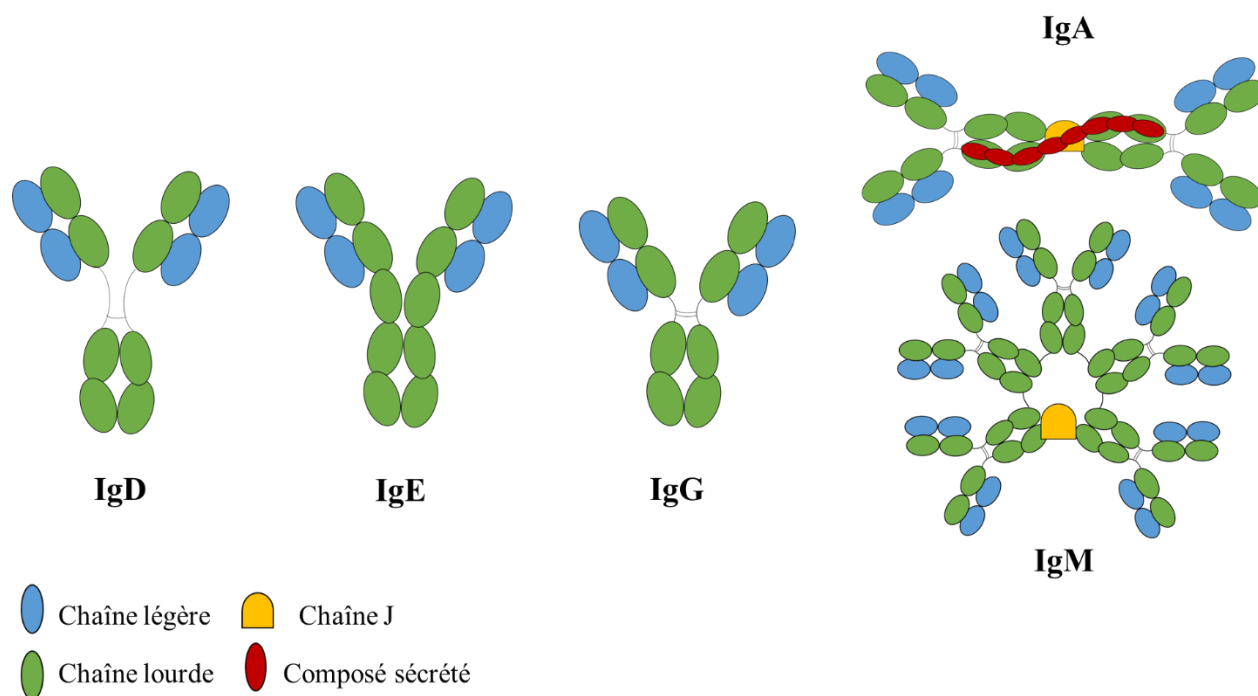


Figure 2-1 : Schématisation des différents isotypes des immunoglobulines chez les mammifères

Les immunoglobulines A (IgA) se retrouvent principalement dans les sécrétions des muqueuses comme la salive, le lait maternel et les larmes. Les IgA représentent environ 10 % des anticorps totaux et sont parfois dimérisées (Paul, 2012). Moins de 1 % des immunoglobulines du plasma sont des IgD et leur fonction précise est inconnue à ce jour (Paul, 2012). Les IgE sont aussi peu abondantes chez l'homme et sont présentes à la surface de certaines cellules immunitaires comme les granulocytes basophiles et les mastocytes. Ces anticorps sont notamment connus pour leur implication dans différentes réactions allergiques chez l'homme entraînant la production d'histamine (Male and Roitt, 2007). Les IgM représentent environ 10 % des anticorps chez l'homme et sont impliquées dans la réponse innée du système immunitaire (Paul, 2012). Elles



peuvent être présentes à la surface des cellules B du système immunitaire ou encore être solubles sous forme de pentamères ou d'hexamères (Paul, 2012). Enfin, les immunoglobulines G (IgG) représentent environ 75 % des anticorps totaux (Paul, 2012). Elles sont produites en réaction à la présence d'un antigène dans l'organisme par le système immunitaire adaptatif (Vidarsson et al., 2014). Nous les décrivons de façon plus détaillée dans les prochains paragraphes, car elles se situent au cœur de cette thèse de doctorat.

## 2.1.2 Immunoglobuline G

Les immunoglobulines G sont des anticorps dont la taille est d'environ 150 kDa et qui sont composées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes légères identiques ainsi que deux chaînes lourdes identiques. Ces quatre chaînes peuvent à leur tour être décomposées en parties variables et constantes (Figure 2-2) (Brezski and Almagro, 2012). Les régions variables comprennent elles-mêmes trois sections dites hypervariables (CDR). C'est principalement grâce à ces dernières que les anticorps reconnaîtront de manière hautement spécifique les épitopes présents sur les différents antigènes (Male and Roitt, 2007). La partie de l'immunoglobuline reconnaissant l'antigène est aussi appelée *fragment antigen binding* (Fab) alors que l'autre partie est aussi nommée la portion cristallisable (Fc), car cette dernière tend à cristalliser en solution (Abbas and Lichtman, 2007).

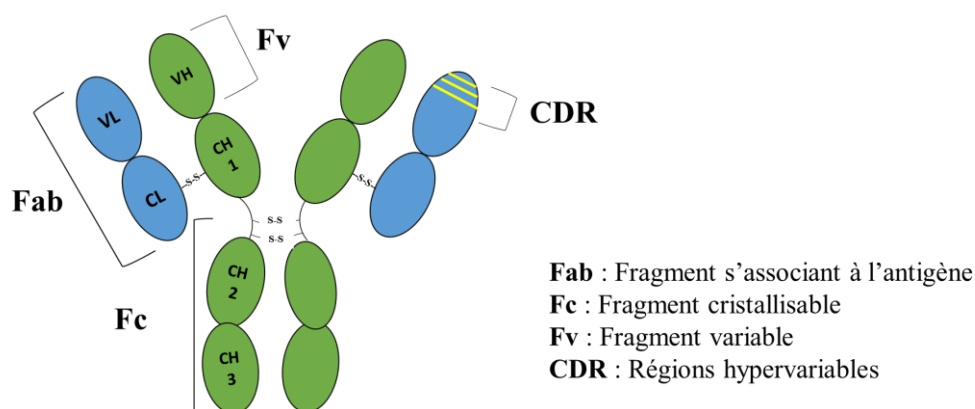


Figure 2-2: Schématisation d'une IgG

*VL : partie variable, chaîne légère ; CL : partie constante, chaîne légère ;  
 VH : partie variable, chaîne lourde ; CH1 : partie constante, chaîne lourde, domaine 1 ; S-S : pont disulfure*

Il y a deux types de chaînes légères : les chaînes de type kappa ( $\kappa$ ) et lambda ( $\lambda$ ) qui diffèrent au niveau de leur région constante, même si elles ont la même fonction. La majorité des IgG utilisées à des fins thérapeutiques possèdent des chaînes légères de type kappa (Abbas and Lichtman, 2007). Sur chacune des chaînes lourdes, au résidu asparagine 297 (Asn-297), se trouve un site de N-glycosylation. Ce site influence, entre autres, la flexibilité de la région charnière de l'anticorps (Jefferis, 2005; Radaev and Sun, 2002). Cette flexibilité est importante, notamment lors de la reconnaissance de l'épitope afin que l'anticorps puisse s'associer à différentes tailles d'antigènes (Parham and Masson, 2003).

### 2.1.2.1 Isotypes

Il existe quatre classes d'immunoglobuline G : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 (Figure 2-3), qui ont été nommées par ordre décroissant d'abondance chez l'Homme (60 %, 32 %, 4 % et 4 %, respectivement) (Vidarsson et al., 2014). Même si leur composition en acides aminés est similaire (90 % de similitude), l'association à l'antigène, l'activation du complément, l'activation des cellules effectrices, la demi-vie et le transport via le placenta varient en fonction de la classe de l'IgG (Vidarsson et al., 2014).

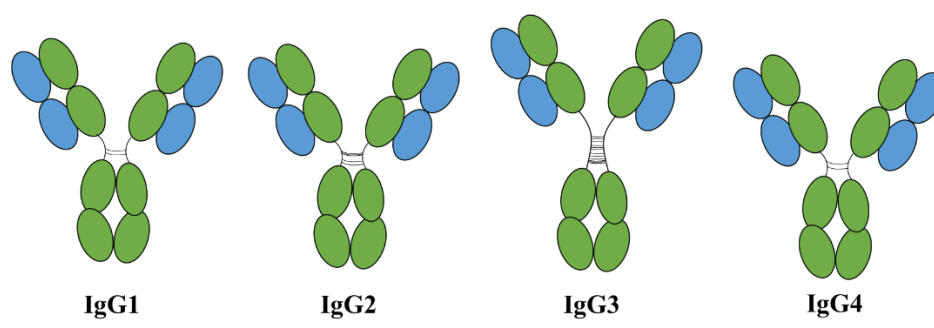


Figure 2-3 : Différentes classes de l'immunoglobuline G

Les IgG1 en circulation peuvent s'associer à un antigène soluble ou une protéine membranaire (Ferrante et al., 1990). La classe 1 tout comme la classe 3 interagit avec tous les récepteurs Fc ainsi que le complément (les récepteurs Fc ainsi que leurs mécanismes d'action seront

discutés à la section 2.2) (Vidarsson et al., 2014). Les IgG2 reconnaissent principalement les polysaccharides capsulaires des bactéries comme antigène (Ferrante et al., 1990; Siber et al., 1980). Cette classe d'immunoglobuline G s'associe faiblement à certains récepteurs Fc et au complément. Les IgG1, IgG2 et IgG4 sont très similaires au niveau de leur région charnière d'un point de vue structural (cette dernière comprend 12 résidus), leur temps de demi-vie est aussi identique, soit de 21 jours (Vidarsson et al., 2014). La troisième classe d'immunoglobuline G correspond aux anticorps pro-inflammatoires puisqu'ils sont efficaces pour induire les fonctions effectrices du système immunitaire, en ayant une grande affinité pour les récepteurs FcγRs. Leur demi-vie est plus courte que celles des IgG des autres classes, probablement pour éviter une réponse inflammatoire excessive. Sa région charnière est la plus longue de toutes les IgG et la longueur de celle-ci varie en fonction de l'allotype (Vidarsson et al., 2014). Les anticorps IgG4 sont souvent formés suite à une exposition répétée à un antigène dans un contexte non infectieux, comme un allergène (Aalberse et al., 2009).

### **2.1.2.2 Utilité pour l'industrie biopharmaceutique**

Les anticorps monoclonaux (AcMs) sont monospécifiques et proviennent d'une même cellule immunitaire, contrairement aux anticorps polyclonaux qui proviennent de différentes cellules. Il est possible de générer des AcMs à partir d'hybridomes ou encore par la technologie de l'ADN recombinant (Little et al., 2000; Liu, 2014; Paul, 2012). Les AcMs ont une région CDR uniforme, ce qui assure une spécificité constante dans un même lot. Peu après 1975, les anticorps monoclonaux sont rapidement devenus un outil indispensable pour diagnostiquer des maladies et pour la mise en place de tests de détection en laboratoire. En effet, leur capacité à s'associer de manière hautement spécifique à un épitope d'un antigène les rend très utiles pour des tests immunologiques, la cytométrie en flux et l'ELISA, pour ne nommer que quelques techniques courantes (Liu, 2014; Ribatti, 2014; Weiner, 2015).

En parallèle de leur utilisation au laboratoire, le rôle crucial des IgG dans la réponse du système immunitaire les rend attrayantes pour développer de nouvelles thérapies. Il y a 20 ans environ, des chercheurs ont considéré l'utilisation de ces anticorps en oncologie pour détruire les cellules cancéreuses (Weiner, 2015). Les premières tentatives utilisaient des anticorps murins, ce qui a occasionné certains problèmes: leur court temps de demi-vie chez le patient obligeait des injections fréquentes alors que la réaction immunitaire contre l'anticorps murin ainsi que la capacité de

l'anticorps à interagir avec les cellules effectrices du système immunitaire étaient aussi des obstacles à une utilisation fréquente (Weiner, 2015). Par la suite, ces derniers verrous ont été levés grâce à plusieurs modifications génétiques visant à produire des anticorps chimériques « souris-humain » ou mieux, des anticorps humanisés (Figure 2-4) (Elvin et al., 2013). Ces deux types d'anticorps ont moins de chance d'être reconnus comme des antigènes par le système immunitaire du patient, interagissent avec les cellules effectrices du système immunitaire et ont une demie-vie plus importante (Parham and Masson, 2003).

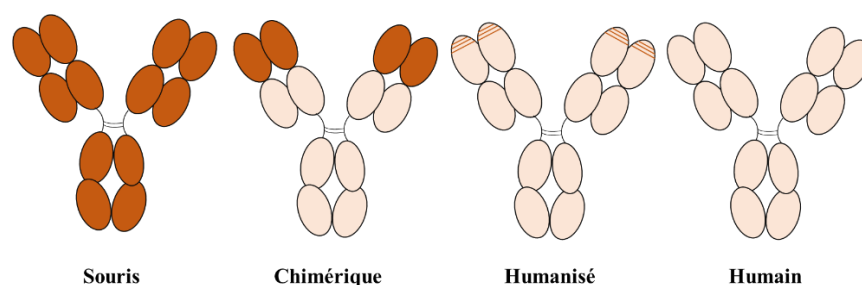


Figure 2-4 : Formats d'anticorps thérapeutiques

Dans les dernières années, plusieurs compagnies pharmaceutiques ont mis sur le marché des anticorps monoclonaux afin de traiter différents types de maladies ou complications chez l'Homme. Le tableau suivant présente quelques IgG utilisés en médecine.

Tableau 2-1 : Exemples d'IgG commercialisés (Elvin et al., 2013)

<b>Nom commercial</b>	<b>INN<sup>1</sup></b>	<b>Forme</b>	<b>Traitement</b>	<b>Système de production</b>
<b>Cancer</b>				
Herceptin	Trastuzumab	Humanisé	Cancer du sein Carcinome gastrique et gastroesophagien	CHO
Avastin	Bevacizumab	Humanisé	Cancer colorectal	CHO
Vectibix	Panitumumab	Humain	Carcinome colorectal	CHO
<b>Inflammatoire</b>				
Humira	Adalimumab	Humain	Arthrite	CHO
<b>Auto-immune</b>				
Tysabri	Natalizumab	Humanisé	Sclérose en plaques Maladie de Crohn	NS/0
Remicade	Infliximab	Chimère	Maladie de Crohn Colite ulcéreuse	SP2/0
<b>Respiratoire</b>				
Xolair	Omalizumab	Humanisé	Asthme allergique Urticaire chronique	CHO

<sup>1</sup> Dénomination commune internationale

## 2.2 Récepteurs Fc $\gamma$

Les recherches des 50 dernières années ont démontré que les mécanismes d'action des récepteurs Fc (FcR) sont beaucoup plus vastes que la destruction des pathogènes. Ces récepteurs ont différentes structures et fonctions et représentent un système hautement sophistiqué pour moduler/réguler les réponses immunitaire et inflammatoire. Les FcRs activent et modulent les systèmes pro-inflammatoires et cytotoxique. Ils sont nécessaires pour détruire les pathogènes et même pour neutraliser certains anticorps. Ils sont tout aussi importants pour la réponse humorale du système immunitaire contre plusieurs pathogènes qui tentent de contourner les mécanismes d'action des FcRs. De plus, ces récepteurs jouent un rôle majeur dans la réponse adaptative puisqu'ils contribuent à la régulation des cellules B. Ils sont en mesure de libérer un antigène capturé par un anticorps afin de stimuler davantage le système immunitaire. Finalement, ils jouent aussi un rôle dans le contrôle du transport des anticorps circulant dans le corps (Concetti and Napolioni, 2010; Hogarth and Pietersz, 2012; Hulett and Hogarth, 1994; Ravetch, 2010). Cette famille de récepteurs peut être divisée en deux types. Le type I comprend les récepteurs « classiques » de la superfamille des Ig, c'est-à-dire les récepteurs Fc $\gamma$  (I, II<sub>a/b/c</sub>, III<sub>a/b</sub>), le récepteur de l'immunoglobuline E, Fc $\epsilon$ RI et le récepteur l'immunoglobuline A, Fc $\alpha$ RI. Le type II comprend des lectines de type C (*C-type lectin* – lectines qui nécessitent du calcium pour l'association aux différents sucres) comme le récepteur Fc $\epsilon$ RII et le sialo-récepteur DC-SIGN. D'autres récepteurs Fc n'entrent pas dans ces deux catégories. C'est le cas du récepteur Fc $\alpha$ / $\mu$  qui s'associe à différentes Igs et du récepteur néonatal (FcRn) qui est relié au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Dans le cadre de ce projet de doctorat, seuls les récepteurs Fc $\gamma$  ont été étudiés et c'est pourquoi seulement ceux-ci seront présentés.

### 2.2.1 Structure des récepteurs Fc $\gamma$

La famille des récepteurs Fc $\gamma$  comprend un récepteur de haute affinité pour les anticorps (Fc $\gamma$ RI,  $K_D \approx 1$  nM) et cinq récepteurs de faible affinité (Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb, Fc $\gamma$ RIIc, Fc $\gamma$ RIIIa et Fc $\gamma$ RIIIb,  $K_D \approx 1$   $\mu$ M, Figure 2-5). Un seul d'entre eux est considéré comme inhibiteur, à cause de son motif intracellulaire ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition*) alors que les autres récepteurs, sauf Fc $\gamma$ RIIIb, ont un motif activateur ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation*). Les mécanismes d'activation et d'inhibition de la réponse immunitaire seront discutés à la section 2.2.2.2.

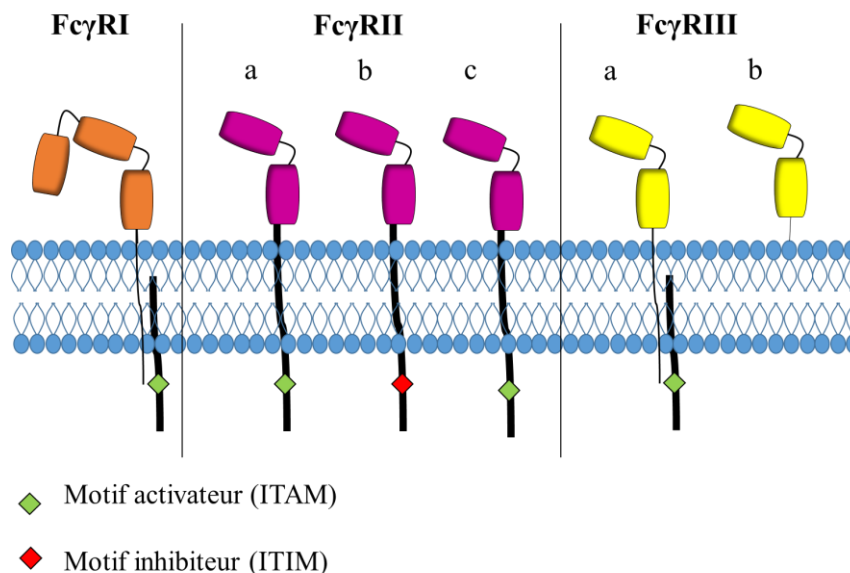


Figure 2-5 : Schématisation des différents récepteurs Fc $\gamma$

### 2.2.1.1 Fc $\gamma$ RI (CD64)

Le récepteur Fc $\gamma$ RI (CD64) est une protéine transmembranaire de 72 kDa composé de trois domaines distincts extracellulaires (D1-3) contrairement aux récepteurs de faible affinité qui n'en contiennent que deux (D1-D2, Figure 2-5) (Abbas and Lichtman, 2007; Heijnen and van de Winkel, 1997; Siberil et al., 2006). Jusqu'à récemment, il était communément accepté que les domaines D1 et D2 de Fc $\gamma$ RI interagissaient faiblement avec les IgG et ce, de façon similaire aux autres domaines présents dans les autres Fc $\gamma$ Rs. De plus, il était admis que le domaine D3 jouait un rôle clé dans la haute affinité du récepteur (Hulett and Hogarth, 1998; Lu et al., 2011). Cependant, des études récentes montrant le récepteur en association avec un IgG1 révèlent que l'interaction se situerait proche du site conservé de N-glycosylation du fragment Fc de l'anticorps (discuté à la section 2.3.3) avec le domaine D2 du récepteur (Lu et al., 2015). De plus, l'orientation de la région charnière de l'anticorps serait modifiée suite à l'association à Fc $\gamma$ RI, contrairement aux récepteurs de faible affinité (Kiyoshi et al., 2015). CD64 contient un motif transmembranaire activateur (ITAM) et est exprimé de manière constitutive sur les monocytes, macrophages et cellules dendritiques (Schiff et al., 1997). Son expression est aussi inductible à la surface des neutrophiles, mastocytes et éosinophiles (Groselj-Grenc et al., 2008). Ce récepteur est défini comme ayant une haute affinité pour les AcMs puisque la constante thermodynamique de

dissociation se situe entre  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$  M et la stœchiométrie d'interaction du récepteur avec l'IgG est de 1 : 1 (Paetz et al., 2005; Woof and Burton, 2004). Par ailleurs, CD64 est le récepteur Fcγ présentant le plus de sites de N-glycosylation. En effet, sept sites ont été répertoriés, mais aucun d'entre eux n'est situé au niveau du site de liaison. De ce fait, il est postulé que la glycosylation du récepteur n'influence pas l'interaction avec l'IgG.

### 2.2.1.2 FcγRII (CD32)

Il existe trois isoformes du récepteur FcγRII chez les humains. Ces isoformes sont identiques à 93 % dans la région extracellulaire (Sondermann et al., 2001; Warmerdam et al., 1993). Comme tous les récepteurs Fcγ de faible affinité, CD32 possède deux domaines extracellulaires distincts (Sondermann et al., 1999b). FcγRIIa et FcγRIIc sont des récepteurs de type activateur, contrairement à FcγRIIb qui est inhibiteur. CD32c est le résultat d'un croisement de gènes entre CD32a et CD32b. Ainsi, son domaine extracellulaire est identique à celui de CD32b alors que sa portion intracellulaire est identique à celle de CD32a (Warmerdam et al., 1993). CD32 a un poids moléculaire d'environ 40 kDa et il est le récepteur de la famille des FcγR qui est présent sur la plus grande variété de cellules chez l'humain (Heijnen and van de Winkel, 1997; Siberil et al., 2006; Walker et al., 1989). En effet, on retrouve CD32a sur les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les plaquettes (Bournazos et al., 2009; Siberil et al., 2006). CD32a permet d'initier l'endocytose, la phagocytose, l'ADCC et la libération de médiateurs inflammatoires (Siberil et al., 2006). CD32b est présent sur les cellules B, les basophiles, les mastocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. CD32b permet de transduire des signaux inhibiteurs afin de diminuer la réponse immunitaire activée par d'autres récepteurs (Siberil et al., 2006). CD32c est exprimé à la surface de certaines cellules NK (Ernst et al., 2002; Pincetic et al., 2014). La stœchiométrie d'interaction entre FcγRIIa et la portion Fc de l'anticorps a été rapportée comme étant de 1:1 en utilisant l'ultracentrifugation analytique (AUC), la résonance magnétique (RMN) et la filtration sur gel (GF) comme techniques d'investigation (Cohen-Solal et al., 2004; Kato et al., 2000; Siberil et al., 2006). Par contre, en modélisant les structures et en utilisant la GF avec une concentration élevée de CD32a, un ratio stœchiométrique de 1:2 a aussi été obtenu (Maenaka et al., 2001; Sondermann et al., 1999b) alors qu'un seul récepteur FcγRIIb et FcγRIIc s'associe à l'anticorps (Pincetic et al., 2014; Sondermann et al., 1999b). Les récepteurs CD32 sont de faible affinité puisque leur constante thermodynamique de dissociation à la région Fc est d'environ  $10^{-6}$



M (Cohen-Solal et al., 2004; Heijnen and van de Winkel, 1997; Maenaka et al., 2001). Trois sites de glycosylation sont présents sur la portion extracellulaire des récepteurs CD32 (Sondermann and Jacob, 1999). Les sites de glycosylation potentiels sur les domaines extracellulaires ne sont pas situés au site de liaison avec l'IgG (Sondermann et al., 1999a). De ce fait, il est attendu que la glycosylation du récepteur n'influence pas ou très peu l'interaction AcM/CD32. D'ailleurs, une étude a montré que CD32b aglycosylé était en mesure de se lier à l'IgG, confirmant ainsi l'hypothèse posée (Sondermann and Jacob, 1999).

### 2.2.1.3 FcγRIII (CD16)

Il existe deux isoformes du récepteur FcγRIII chez les humains: les isoformes a et b. Ces deux isoformes sont à 96 % identiques dans la portion extracellulaire du récepteur (Zhang et al., 2000). Le récepteur CD16a, qui est exprimé principalement sur les macrophages ainsi que sur les cellules NK, comporte deux domaines extracellulaires et est impliqué dans l'ADCC (Abbas and Lichtman, 2007). Il existe deux allotypes pour CD16a, soit avec un résidu phénylalanine (Phe) ou valine (Val) en position 158. L'allotype Val offre une meilleure affinité pour l'IgG1 que celui avec Phe (Yoo and Morrison, 2010). Le poids moléculaire de ce récepteur varie généralement entre 50 et 80 kDa (Gavin et al., 1998). Cette variation est causée par la différence entre les allotypes ainsi que par la glycosylation du récepteur. CD16b, quant à lui, n'est présent que sur les neutrophiles et il est le seul récepteur Fc à être ancré dans la membrane cellulaire via le glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Il comporte le même nombre de domaines extracellulaires que CD16a (Abbas and Lichtman, 2007; Edberg et al., 1992). À ce jour, il n'est toujours pas défini comment CD16b transduit le signal cellulaire, mais l'hypothèse d'une association entre CD16b et CD32a a été posée par plusieurs équipes de recherche. Cette association permettrait d'activer la phagocytose ainsi que la dégranulation, et par conséquent éliminer les pathogènes opsonisés par les neutrophiles (Powell and Hogarth, 2008; Sondermann et al., 2001; Zhang et al., 2000; Zhou and Brown, 1994). Plusieurs études ont démontré que le ratio stœchiométrique d'interaction entre le AcM et CD16 est de 1:1 (Ghirlando et al., 1995; Zhang et al., 2000). De plus, ce type de récepteur est qualifié de faible affinité puisque la constante thermodynamique de dissociation avec l'IgG est de l'ordre de  $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  M (Lu et al., 2011; Radaev and Sun, 2002; Vance et al., 1992). Plusieurs groupes de recherche ont étudié la glycosylation du récepteur CD16. Ce dernier possède cinq sites de N-glycosylation situés aux positions 38, 45, 74, 162 et 169 (Zeck et al., 2011). Parmi ceux-ci, les

positions 45 et 162 se trouvent dans la région d'attachement à l'anticorps et influence l'interaction avec ce dernier (Drescher et al., 2003; Edberg and Kimberly, 1997; Ferrara et al., 2006a; Hanson and Barb, 2015; Hayes et al., 2014; Jefferis et al., 1998; Lund et al., 1990; Zeck et al., 2011).

## 2.2.2 Fonctions

### 2.2.2.1 Association au ligand

La cascade de signalisation suite à l'association entre la portion Fc de l'anticorps et des récepteurs Fc $\gamma$  ne débute pas toujours de la même façon pour le récepteur haute affinité. En effet, comme on peut le constater à la Figure 2-6, CD64 peut d'abord s'associer à un anticorps monomérique sur lequel viendra ensuite s'associer un antigène de façon à modifier la stœchiométrie du complexe. Pour les récepteurs de faible affinité, un complexe immun est d'abord créé (association entre l'anticorps et l'antigène) avant de se lier aux récepteurs Fc $\gamma$  (Daeron, 2014). Dans les deux cas, il y aura une agrégation du récepteur. Lorsqu'un récepteur de faible affinité s'associe à un complexe immun, la concentration et la composition de ce complexe influencent l'avidité de l'interaction Fc $\gamma$ R/IgG. Ce qui importe pour l'association des IgG aux récepteurs Fc $\gamma$  est la concentration locale de la portion Fc des anticorps. Cette concentration dépend de la densité des épitopes présents sur l'antigène et qui sont reconnus par l'anticorps.

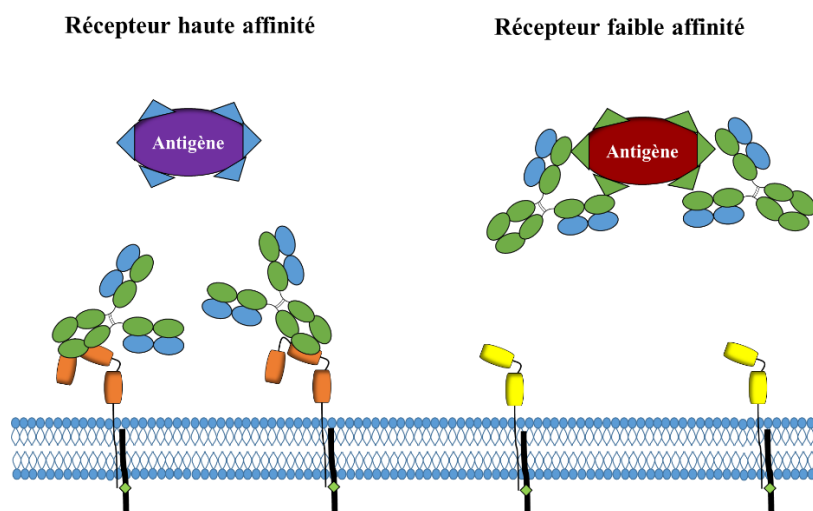


Figure 2-6 : Schématisation de l'association des anticorps et antigènes aux récepteurs Fc $\gamma$

Une situation peu considérée, mais probable est celle concernant un anticorps ciblant un antigène présent à la surface d'une cellule ayant aussi des FcγRs. De façon générale, on présente l'anticorps faisant une association *trans*, c'est-à-dire la portion Fab associée à un antigène d'une cellule cible et la portion Fc associée à un récepteur sur une cellule effectrice (Figure 2-7). Cependant, il est aussi possible d'utiliser un anticorps qui fera une liaison *cis* en s'associant avec un antigène et un récepteur sur la même cellule. Ce type d'association a été utilisé dans le passé pour inhiber l'activation des cellules B en employant un anti-IgG (Phillips and Parker, 1983).

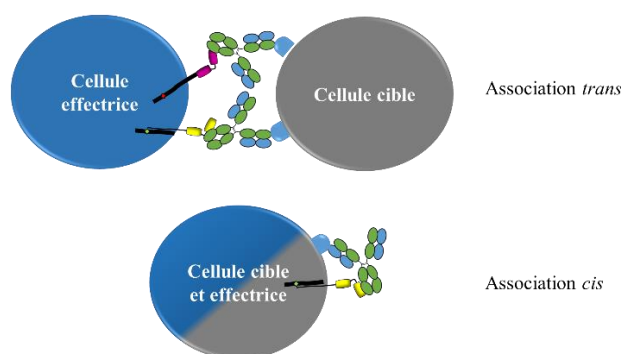


Figure 2-7: Deux modes d'interactions entre les anticorps ayant une affinité pour les antigènes de surface

Tel que discuté précédemment (Section 2.2.1), le récepteur de haute affinité (CD64), ne s'associe pas à la portion Fc de l'anticorps de la même manière que les récepteurs de faible affinité (CD32 et CD16) puisqu'il y a un changement de conformation au niveau du récepteur et de la portion Fc de l'anticorps (Kiyoshi et al., 2015). Tous les récepteurs Fcγ s'associent à la même région de l'anticorps, c'est-à-dire entre le bas de la région charnière et les domaines C<sub>H2</sub> du AcM (Hanson and Barb, 2015). Comme on peut le constater à la Figure 2-8, le site d'interaction est situé près du site conservé de N-glycosylation des IgG. L'impact de la glycosylation sur les interactions sera discuté à la section 2.3.4.

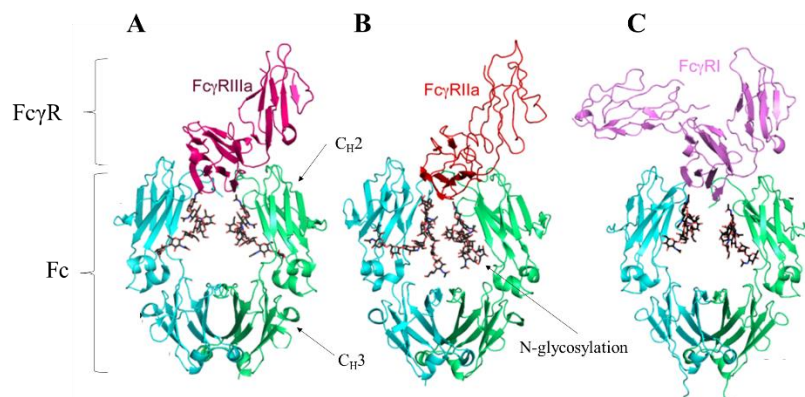


Figure 2-8 : Modèles présentant l'interaction entre les récepteurs Fcγ et la portion Fc de l'anticorps. Adapté de Hanson and Barb (2015). *CD16a* (A), *CD32a* (B) et *CD64* (C)

### 2.2.2.2 Mécanismes d'action des FcγRs

La nature du signal qui suivra l'association FcγR/IgG dépend, entre autres, du type de motif dans la région cytoplasmique du récepteur. Il est possible d'obtenir une réponse activatrice avec les récepteurs CD16, CD32a/c et CD64 (ITAM) ou une réponse inhibitrice avec CD32b (ITIM) (Figure 2-9). Suite à l'agrégation du récepteur, les résidus tyrosine du motif ITAM sont phosphorylés et induisent à leur tour une activation de tyrosine kinase des familles Src et Syk (Jouvin et al., 1994; Pignata et al., 1993; Selvaraj et al., 1989; Swanson and Hoppe, 2004) (Figure 2-9A). La génération de phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) recrute la tyrosine kinase Bruton (BTK) et la phospholipase Cγ (PLCγ), qui amènent à l'activation d'autres kinases qui permettront d'activer la cellule (Bracke et al., 1998; Sanchez-Mejorada and Rosales, 1998). Il est anticipé que les signaux intracellulaires suite à l'agrégation du récepteur activeront la cellule, mais les effets biologiques précis dépendent grandement du type cellulaire. Parmi ces réponses, on retrouve, entre autres, la cytotoxicité dépendante de la présence d'anticorps (ADCC) et la phagocytose qui seront expliquées un peu plus loin (Figure 2-10). Afin de contrebalancer les signaux activateurs, le FcγRIIb induit l'inhibition du signal (Figure 2-9B). Son importance a été démontrée dans le cas de maladies auto-immunes et d'inflammations chroniques lorsque l'expression et l'activité de ce récepteur étaient affectées (Bournazos et al., 2009). Tout comme le motif activateur, le motif ITIM est d'abord phosphorylé par des kinases Src ce qui permet le recrutement de la phosphatase SHIP. Cette phosphatase hydrolyse le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> en

phosphatidylinositol 4,5-triphosphate (PtdIns(4,5)-P<sub>2</sub>), ce qui inhibe le recrutement et l'activation de la BTK et de la PLC $\gamma$ . La phosphatase SHIP inhibe aussi la cascade de réactions normalement présente lors de la présence d'un motif activateur. Ces effets intracellulaires permettent le balancement de tous les signaux induits par les Fc $\gamma$ Rs, limitant ainsi l'activation des cellules et des réponses effectrices. Cependant, sur une cellule n'ayant pas de signaux activateurs (ex. cellule B), Fc $\gamma$ RIIb régule la survie cellulaire et la production d'anticorps (Bolland and Ravetch, 2000).

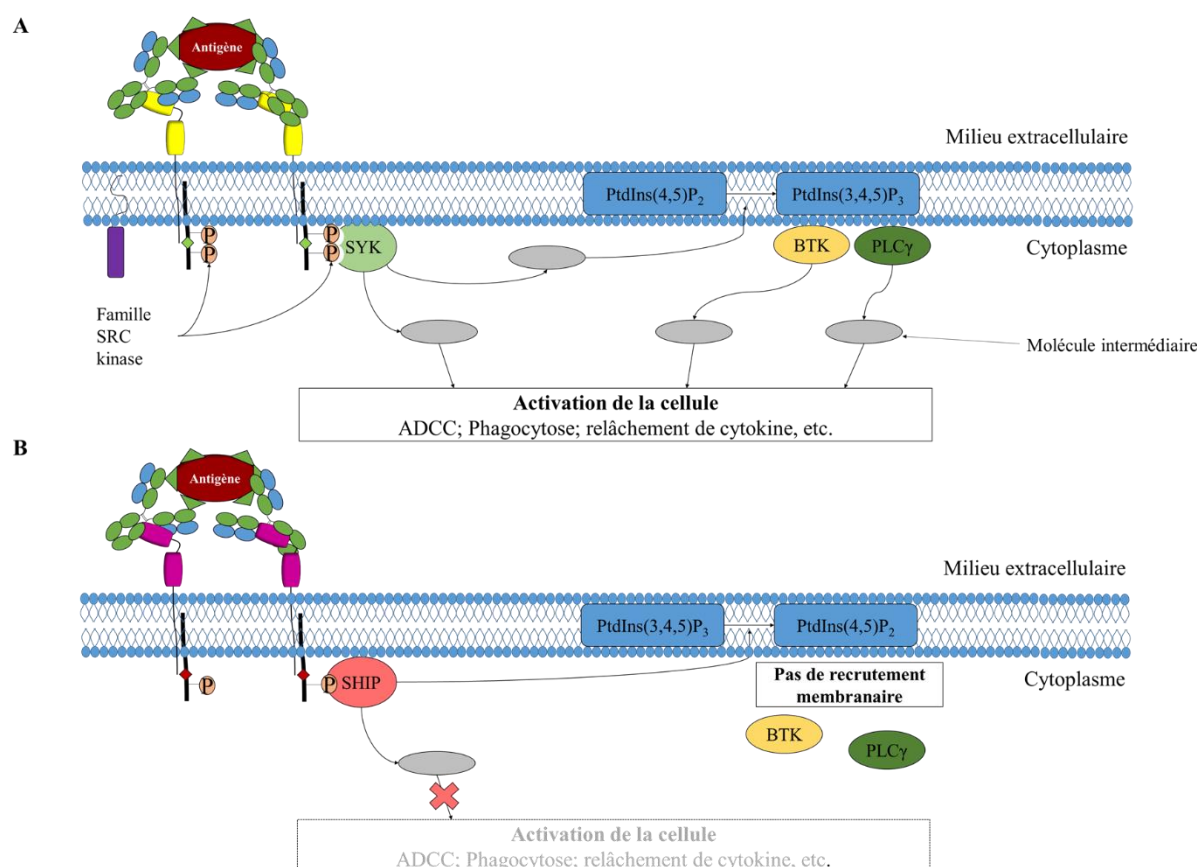


Figure 2-9 : Schématisation des mécanismes d'activation (A) et d'inhibition (B) liés aux récepteurs Fc $\gamma$

Cette activation du signal peut mener à la sécrétion de médiateurs inflammatoires comme des cytokines et/ou permettre la destruction de l'antigène par le processus de cytotoxicité dépendante de la présence d'anticorps (Figure 2-10A). L'ADCC correspond à la sécrétion de protéases et de glycoprotéines par la cellule effectrice (par exemple, les cellules NK) qui permet la destruction de

la cellule cible. Ce mécanisme est principalement activé lorsqu'il y a une interaction avec le récepteur de faible affinité  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ . L'activation du signal cellulaire peut aussi conduire à l'internalisation de l'antigène soit par endocytose ou phagocytose, grâce à l'interaction entre le fragment Fc et le récepteur de haute affinité  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ , par exemple (Figure 2-10B).

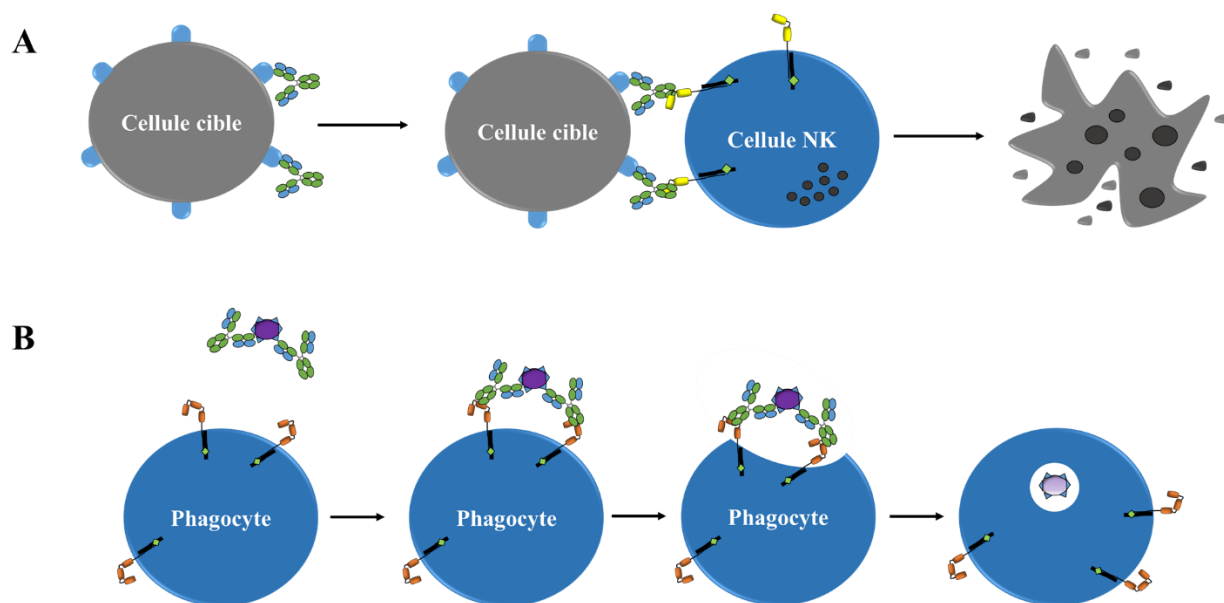


Figure 2-10 : Schématisation des étapes générales de l'ADCC (A) et de la phagocytose (B)

## 2.3 Glycosylation

Contrairement à la synthèse d'une protéine, qui correspond à une traduction stricte et unique de l'ARN messager mature, la glycosylation est une étape post-traductionnelle dont le résultat hautement variable dépend fortement du type de cellule et de son état. De plus, pour une protéine donnée, la glycosylation peut se produire sur différents sites de la protéine, ce qui complexifie le patron final obtenu. Il est à noter que différentes enzymes impliquées dans la glycosylation sont présentes dans les différents types cellulaires (plantes, levures, mammifères); ces différences influencent grandement le patron de glycosylation obtenu (Brooks, 2010). Dans le cadre de ce projet, seules les cellules de mammifère sont utilisées, nous nous concentrerons donc sur la description du mécanisme de glycosylation dans ce type cellulaire seulement.

Les cellules de mammifère sont toutes capables de produire des chaînes de glycans complexes, similaires d'une espèce à l'autre. Dans ces polymères saccharidiques, on retrouve, entre autres, des résidus de mannose (Man), fucose (Fuc), galactose (Gal), N-acétylglycosamine (GlcNAc) et N-acétylneuraminique (NeuAc) (Figure 2-11). Cependant, les différentes cellules de mammifère ne possèdent pas toutes les mêmes enzymes dans l'appareil de Golgi, ce qui apporte des différences entre les espèces. Par exemple chez la souris, il est possible d'avoir un disaccharide de galactose terminal ( $\alpha$ -Gal) qui est très immunogène pour l'humain. De plus, les acides sialiques de la souris peuvent être des (NeuAc) comme chez l'humain, mais peuvent aussi être présents sous la forme N-glycolylneuraminiques (NeuGc) qui a lui aussi un pouvoir immunogène chez l'humain. Ces derniers représentent jusqu'à 50 % des acides sialiques d'une souris (Baker et al., 2001).

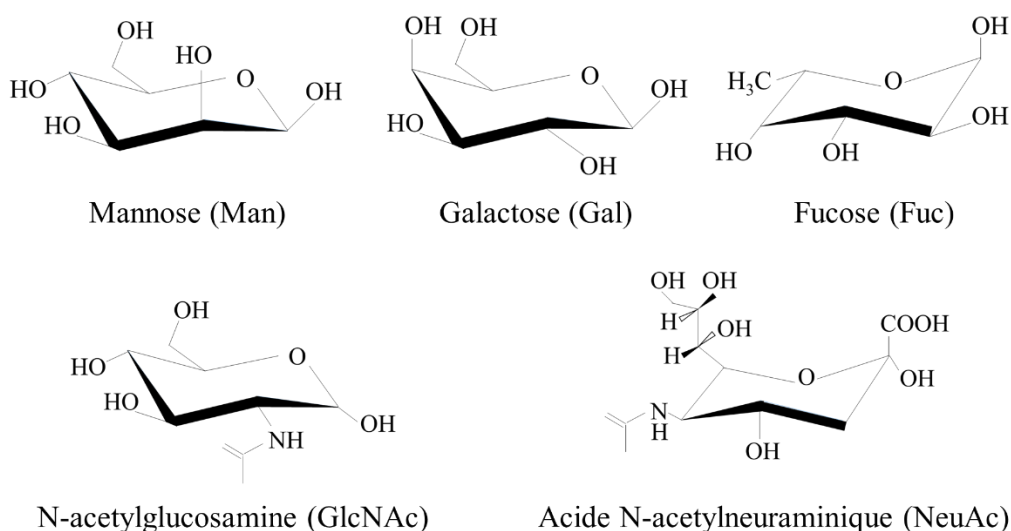


Figure 2-11 : Schématisation des principaux glycans présents chez l'humain

L'ajout de glycanes est la résultante d'une suite de réactions enzymatiques dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Cette modification post-traductionnelle influence certaines propriétés physiques de la protéine tels que le volume occupé et le caractère hydrophile de la protéine (Walker and Rapley, 2008). De ce fait, l'activité, la stabilité, le pouvoir immunogène ainsi que le temps de demi-vie sont influencés par la glycosylation (Brooks, 2010). On distingue deux types d'hétérogénéité au sein de la glycosylation. Afin de décrire la glycosylation des

protéines, les termes macro- et microhétérogénéités sont souvent employés: la macrohétérogénéité réfère à la présence/absence de glycan sur un site donné alors que la microhétérogénéité correspond au type et à l'ordre des oligosaccharides ajoutés à la chaîne (Sarah, 2005). De plus, deux types de glycosylation peuvent être présents sur les protéines; N-glycosylation ainsi que l'O-glycosylation (Gabijs, 2009).

### **2.3.1 O-glycosylation & N-glycosylation**

La O-glycosylation est plus simple que la N-glycosylation et la formation de la structure se produit dans l'appareil de Golgi (Brooks, 2010) (Figure 2-12A). Sur l'oxygène (O) d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) est attaché le premier monosaccharide, d'où le terme O-glycosylation. Contrairement à l'autre modèle de glycosylation, celui-ci ne semble pas contenir de séquence « cœur » et contient généralement entre un et vingt résidus (Brooks, 2010). On retrouve principalement trois types de monosaccharides dans l'O-glycosylation : le galactose (Gal), le N-acétylglucosamine (GlcNAc) ainsi que le N-acétylgalactosamine (GalNAc) (Georgen et al., 2011).



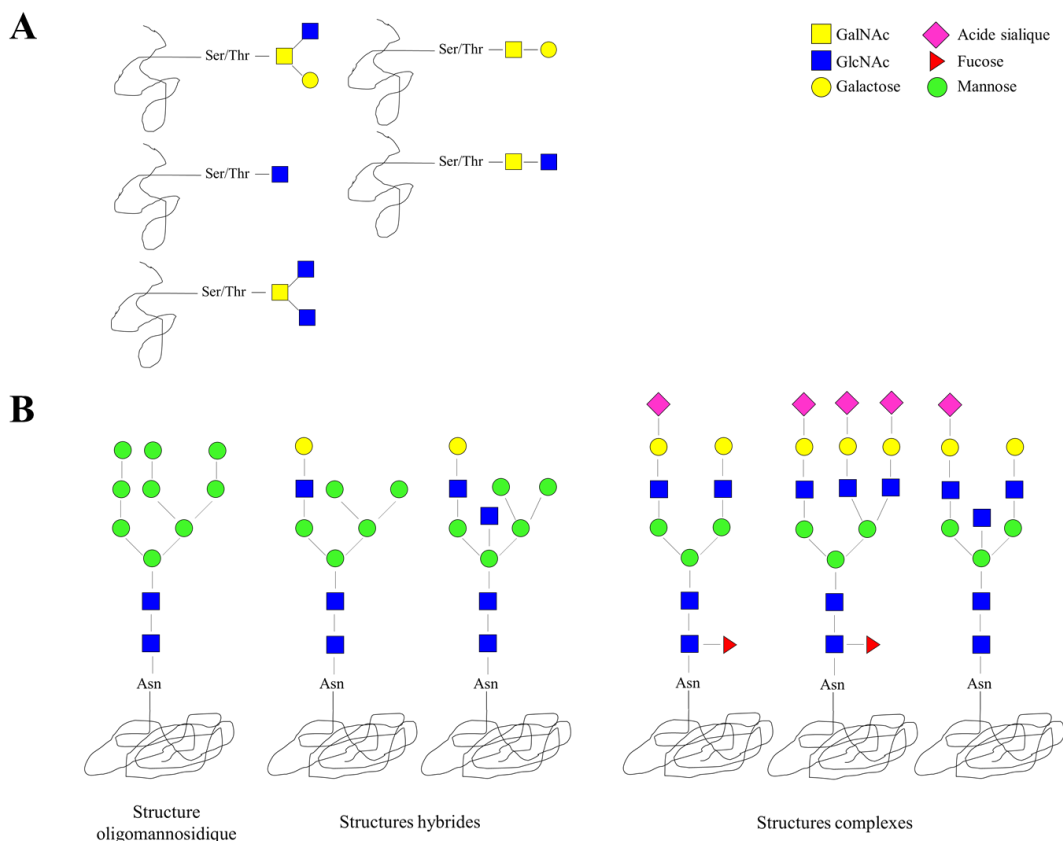


Figure 2-12 : Principales structures de la O-glycosylation (A) et N-glycosylation (B)

La N-glycosylation est plus complexe; elle a une grande influence sur la structure générale de la protéine (Kornfeld and Kornfeld, 1985; Spellman, 1990). Les réactions enzymatiques débutent dans le RE et se terminent généralement dans l'appareil de Golgi (Gabijs, 2009). On nomme ce type de glycosylation ainsi, puisque le premier résidu est attaché à l'azote (N) de l'asparagine (Asn) contenue dans le polypeptide. Cette réaction ne se produit que sur une Asn contenue dans la séquence Asn – X – Ser/Thr (où X correspond à n'importe quel acide aminé sauf la proline). Les facteurs permettant de contrôler la N-glycosylation de l'Asn ne sont toujours pas compris (voir section 2.3.5) (Brooks, 2010; Gabiys, 2009). Par ailleurs, une séquence « cœur » est présente sur n'importe quelle variante de la N-glycosylation; elle comprend 3 résidus mannose et deux N-acétylglucosamine ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ). Bien qu'il existe un grand nombre de variantes, les trois principales structures (mannosylée, hybride et complexe) sont présentées à la Figure 2-12B. La structure hautement mannosylée contient essentiellement des résidus mannose (Man) outre le cœur

de la séquence. Une structure hybride va contenir à la fois des résidus Man et le N-acétylglucosamine (GlcNAc) ainsi que du galactose (Gal). La structure complexe quant à elle peut présenter des acides sialiques (NeuAc) en bout de chaîne et du fucose (Fuc) (Butler and Spearman, 2014; Gabius, 2009; Georgen et al., 2011).

### 2.3.2 Étapes de la N-glycosylation

Tel que mentionné plus haut, le processus de la N-glycosylation s'effectue dans deux compartiments cellulaires, soient le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Les étapes initiales de la synthèse du précurseur de la N-glycosylation ont lieu dans la membrane du RE. La biosynthèse du précurseur  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  sur un accepteur lipidique (Dolichol-P) s'effectue d'abord sur la face cytosolique de la membrane et se termine sur la face luminale du RE (Figure 2-13- cycle des dolichols). Le N-glycane est ensuite transféré sur le squelette d'une protéine en élongation et il subira ensuite différentes modifications enzymatiques, notamment pour enlever les résidus glucose (Figure 2-13- losange brun). Il est important de noter que la forme  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  du N-glycane subira un test de « contrôle qualité » afin de s'assurer que les glycoprotéines nouvellement produites ont une conformation adéquate dans le RE. Si la protéine est bien repliée, elle continuera sa maturation dans l'appareil de Golgi où elle passera par les compartiments *cis*, *médian* et *trans* pour finaliser le processus de glycosylation. Si l'enzyme mannosidase golgienne I (Figure 2-13- étape 5) ne permet pas la modification du glycane, la glycosylation aura une structure oligomannosidique. Pour obtenir une structure hybride, un résidu GlcNAc est ajouté au mannose central avant que la mannosidase golgienne II puisse enlever les résidus mannose ((Figure 2-13- étape 7). Les étapes subséquentes permettent l'obtention d'une structure complexe avant la sécrétion de la protéine glycosylée (Butler, 2006; Gabius, 2009; Kornfeld and Kornfeld, 1985)

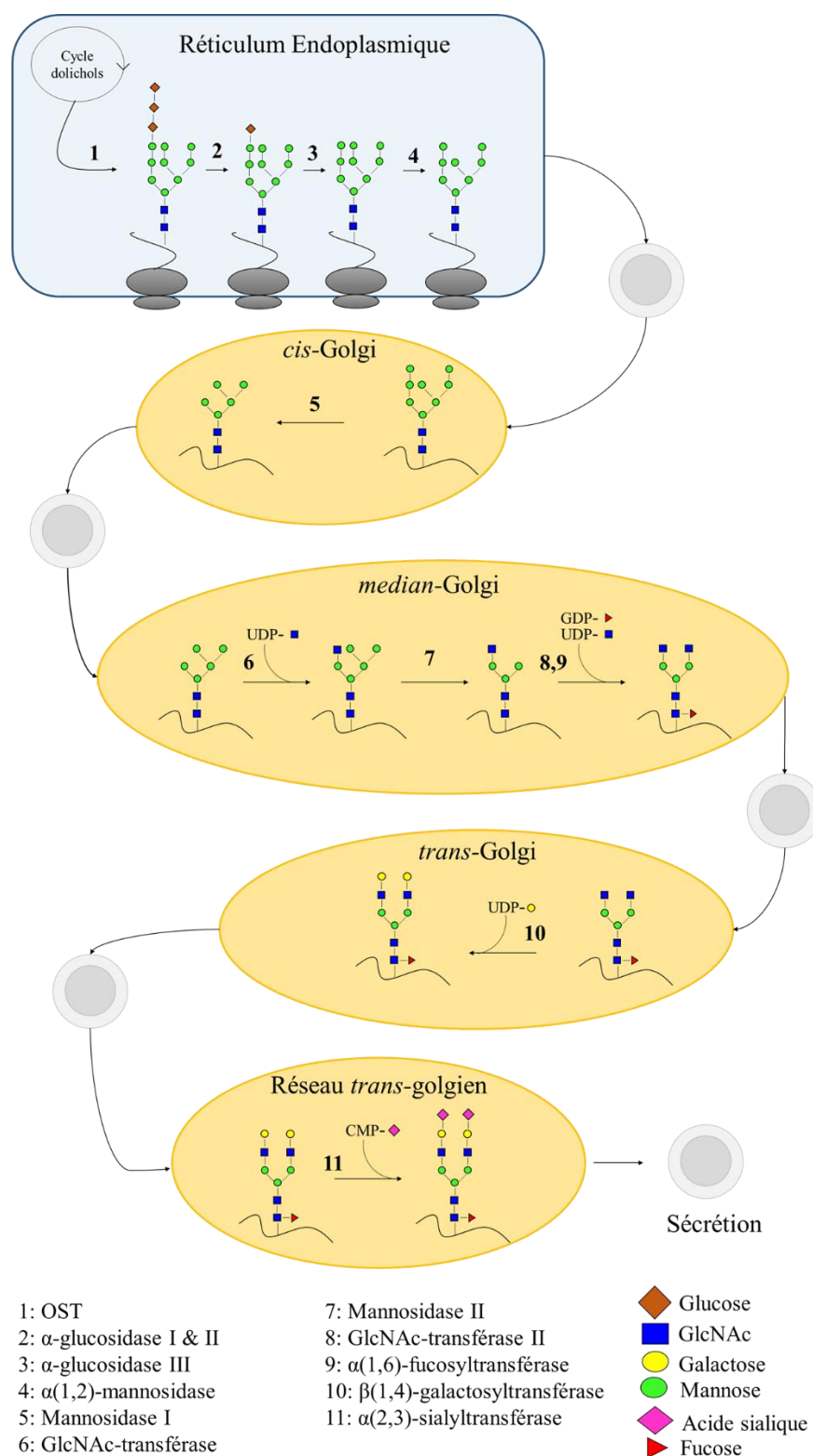


Figure 2-13 : Schématisation des étapes de la N-glycosylation dans les cellules de mammifère.

*Inspiré de Georgen et al. (2011)*

### 2.3.3 Glycosylation des anticorps

Deux sites conservés de N-glycosylation sont présents sur la portion Fc des IgGs. D'un point de vue structural, les glycans se retrouvent dans une « poche » formée des deux domaines C<sub>H2</sub> de l'anticorps (Figure 2-8). Les N-glycanes sont majoritairement limités à la structure complexe bi-antennaire (*di-antennary*) comprenant une galactosylation et une sialylation partielle (Krapp et al., 2003; Voynov et al., 2009; Wormald et al., 1997). La structure la plus courante pour les IgG chez l'humain est la forme complexe fucosylée présentant un résidu galactose (G1F). Les deux autres structures communes sont aussi complexes et fucosylées, mais elles présentent soit aucun soit deux résidus galactose (G0F and G2F). Par ailleurs, 10 à 20 % des IgG humains sont sialylés, plus particulièrement la forme G2F (G2FS1) (Anumula, 2012; Holland et al., 2006; Wuhler et al., 2007)

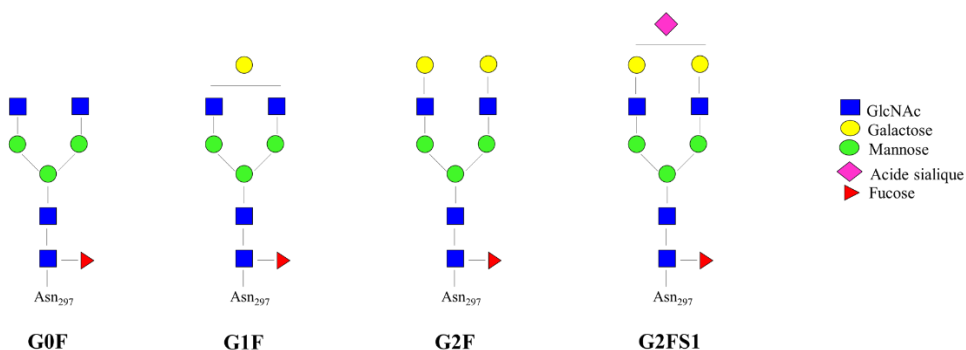


Figure 2-14 : Principales structures des oligosaccharides attachés à l'immunoglobuline G

### 2.3.4 Influence de la glycosylation

Depuis plusieurs années, un nombre croissant de groupes de recherche étudie l'impact de la glycosylation des anticorps sur leur interaction avec les récepteurs Fcγ. La glycosylation est essentielle aux fonctions immunitaires de l'anticorps puisqu'un anticorps aglycosylé n'interagira pas avec le FcγRIIIa (An, 2011; Arnold et al., 2007; Brooks, 2010; Jefferis et al., 1995; Spearman et al., 2011). Il a été démontré que la perturbation d'un patron de glycosylation « normal » est présente lors de certaines maladies. Par exemple, il existe une corrélation entre l'absence de galactose en position terminale et l'arthrite rhumatoïde (Parekh et al., 1985). Les formes galactosylées varient avec l'âge ; elles augmentent jusqu'à 25 ans et diminuent ensuite (Huhn et al., 2009; Parekh et al., 1985; Shikata et al., 1998; Yamada et al., 1997). La présence de

« *bisecting* » GlcNAc varie aussi en fonction de l'âge (Huhn et al., 2009; Yamada et al., 1997). Ces études démontrent l'impact de la glycosylation sur les fonctions immunitaires et soulignent donc l'importance de comprendre comment la présence ou l'absence de certains oligosaccharides peut influencer le pouvoir thérapeutique des anticorps produits.

L'influence du fucose sur la chaîne de glycans de la portion Fc de l'anticorps a été largement étudiée. Toutes les études montrent que le fucose présent au site de N-glycosylation des AcMs diminue l'affinité avec les récepteurs Fcγ, et donc diminue leur pouvoir thérapeutique (Ferrara et al., 2011; Houde et al., 2010; Scallon et al., 2007b; Shibata-Koyama et al., 2009; Shields et al., 2002). À titre d'exemple, Shinkawa et collègues ont démontré qu'une IgG1 ne présentant pas de résidu fucose avait une capacité de liaison avec FcγRIIIa 50 fois plus élevée (Shinkawa et al., 2003). Le fucose cause un encombrement stérique qui empêche l'interaction optimale du site de glycosylation à la position N162 du FcγRIIIa avec l'un des deux glycanes du Fc de l'anticorps. Cette interaction entre les deux patrons de glycosylation, spécifique de l'interaction FcγRIIIa-IgG, joue un rôle majeur dans l'affinité des deux molécules.

La présence de GlcNAc bissecteur (*bisecting* – bGlcNAc) se traduit par une meilleure liaison au FcγRIIIa et une meilleure ADCC sur une IgG (Davies et al., 2001; Umana et al., 1999). Une compétition entre deux enzymes de la glycosylation (GnTIII et l'α1,6-fucosyltransférase) a pour effet de réduire la fucosylation lorsque le AcM présente le résidu bGlcNAc.

Tel que mentionné plus tôt, le galactose sur les anticorps est corrélé avec certaines maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde. Les niveaux G0F (agalactosylé) des AcMs en circulation sont directement liés à des maladies inflammatoires, ce qui laisse supposer qu'un anticorps agalactosylé aura une meilleure liaison au récepteur FcγRIIIa et une meilleure ADCC qu'un anticorps ayant des résidus galactose (Parekh et al., 1985; Rademacher et al., 1994; Scherer et al., 2010). Cependant, une étude présentant différents patrons de glycosylation d'une IgG a démontré qu'un profil hypergalactosylé s'associait trois fois plus à FcγRIIIa qu'un profil « normal » (Houde et al., 2010). Il serait donc intéressant de continuer les recherches afin de mieux comprendre l'effet du galactose sur les interactions avec les récepteurs Fc.

Il a aussi été démontré que la présence d'acide sialique permet d'augmenter le temps de demi-vie, et modifie la solubilité de la glycoprotéine (Anthony and Ravetch, 2010; Georgen et al., 2011).

Cependant, d'autres résultats montrent que la demi-vie des IgG n'est pas influencée par la présence d'acide sialique dans son profil de glycosylation (Naso et al., 2010; Raju et al., 2000). La demi-vie de l'IgG est influencée par l'interaction avec le récepteur FcRn (Section 2.2) et cette interaction est indépendante de la glycosylation de l'anticorps (Kanda et al., 2007; Khawli et al., 2010). La présence d'acide sialique sur l'anticorps diminue l'interaction entre celui-ci et les récepteurs Fcγ, diminuant ainsi l'ADCC (Kaneko et al., 2006; Scallon et al., 2007b). Ceci s'explique par un changement de conformation de la portion Fc de l'anticorps en présence de ce résidu sur la chaîne de glycanes (Figure 2-15) (Pincetic et al., 2014; Sondermann et al., 2013). La situation inverse (absence d'acide sialique) favorise l'association de l'anticorps avec des récepteurs Fcγ et induit une réponse auto-immune (Arnold et al., 2007; Nimmerjahn et al., 2007). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Houde. Tout comme le galactose, il semble y avoir encore beaucoup de questionnements par rapport à l'effet pro/anti-inflammatoire des acides sialiques sur les AcMs. Certaines études n'utilisent pas les mêmes anticorps ou ne caractérisent pas clairement le profil de glycosylation, ce qui rend difficile la comparaison des résultats.

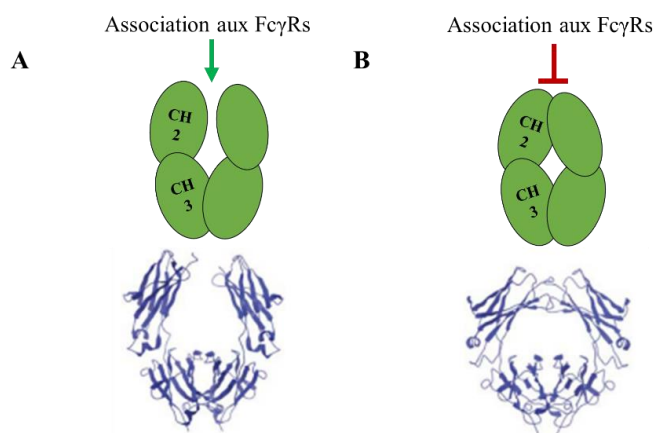


Figure 2-15 : Schématisation du site d'attachement des FcγRs à la portion Fc des IgG en présence d'acide sialique. Adapté de Pincetic et al. (2014). *La conformation de la portion Fc varie en fonction de la sialylation. L'absence de sialylation permet une configuration ouverte (A) alors que la présence d'acide sialique favorise une conformation fermée (B)*

### 2.3.5 Contrôle de la glycosylation

Étant donné l'importance des réponses effectrices du système immunitaire suite à l'association de l'anticorps aux récepteurs Fcγ, il est attendu que plusieurs mécanismes de régulation ont évolué afin de contrôler la glycosylation de la portion Fc des IgGs. Même si le mécanisme précis n'est pas complètement élucidé, il y a une évidence claire de l'existence d'un procédé qui régule la composition du glycan. Par exemple, l'analyse des glycans de la portion Fc des anticorps suite à la vaccination révèle un changement dans l'abondance des anticorps spécifiques à l'antigène ayant des acides sialiques, ce qui a un effet immunomodulateur sur la réponse immunitaire (Selman et al., 2012; Wang et al., 2015). Par ailleurs, des hauts niveaux de sialylation ont été observés chez des patients en rémission de maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde et une diminution de ces résidus lorsqu'il y a une rechute (Espy et al., 2011; van de Geijn et al., 2009). Ces observations démontrent l'importance de la glycosylation du fragment Fc afin de réguler les activités effectrices du système immunitaire.

Puisque plusieurs brevets arriveront à échéance dans les prochaines années, plusieurs compagnies biopharmaceutiques ont mis sur pied des programmes afin de produire et mettre sur le marché des biosimilaires qui permettront aux patients d'obtenir leur traitement à un moindre coût. A ce jour, deux biosimilaires de l'anticorps Infliximab (Remicade®) qui cible le facteur de tumeur de nécrose (*Tumor necrosis factor* – TNF) ont été approuvés : Remsima (Celltrion) et Inflectra (Hospira) (Udpa and Million, 2016). Tel que mentionné précédemment, les médicaments biologiques sont produits à partir de cellules et puisque ce ne sont pas les mêmes cellules qui produisent le médicament similaire, il y aura donc des différences entre la molécule originale et son biosimilaire. Il est question ici, entre autres, de la présence d'agrégat, d'impureté, mais aussi d'un profil de glycosylation différent. Tout comme Santé Canada, le secrétariat américain aux produits alimentaires et pharmaceutiques (*Food and Drug Administration* – FDA) a mis sur pied une marche à suivre basée sur celle déjà établie par l'Union Européenne pour l'approbation d'un biosimilaire (Camacho et al., 2014; SantéCanada, 2010). L'approche est basée sur les études analytiques et cliniques de la nouvelle molécule en comparaison avec la molécule de référence. Les essais analytiques comprennent les structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire, les modifications post-traductionnelles, l'activité de la molécule biologique ainsi que l'identification des impuretés possiblement présentes. L'évaluation de la toxicité dans les modèles animaux et des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques doivent être présentées. Finalement,

l'utilisation du produit doit être sécuritaire (non immunogène)(Camacho et al., 2014). Cette dernière étape est cruciale, car il a été démontré qu'une différence dans la structure (ex. glycosylation) entre un biosimilaire et sa molécule de référence peut influencer le pouvoir immunogène de la glycoprotéine. En effet, une étude clinique en Europe a été terminée plus tôt que prévu, puisque le traitement avec le biosimilaire HX575 (molécule de référence epoetin alfa) a créé une réponse immunitaire chez deux patients (Bennett et al., 2004).

Il n'est pas étonnant que plusieurs groupes de recherche tentent de contrôler la glycosylation des protéines de diverses manières. En plus de permettre une meilleure compréhension de l'impact qu'a la glycosylation sur la qualité de la molécule, le contrôle du processus de la glycosylation offre de nouvelles possibilités comme l'obtention d'un patron enrichi d'une forme souhaitée (ex. fortement galactosylé ou sialylé).

### **2.3.5.1 Cellules hôtes**

Les cellules hôtes influencent grandement le patron de glycosylation obtenu puisqu'elles ne produisent pas toutes les mêmes enzymes. Les cellules ovariennes de hamster (CHO) qui sont les plus utilisées à ce jour pour produire les anticorps thérapeutiques ne possèdent pas les enzymes N-acetylglucosaminyltransferase-III (GnTIII) et  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase-I (ST6Gal-I) contrairement aux cellules humaines (Durocher and Butler, 2009). Ces enzymes permettent l'ajout d'un oligosaccharide GlcNAc central et d'un acide sialique sur un résidu galactose avec un lien  $\alpha$ 2,6, respectivement. Puisque les anticorps circulant dans le corps humain ont majoritairement une sialylation  $\alpha$ 2,6, il est souhaitable d'obtenir une telle sialylation pour un anticorps thérapeutique (Anthony et al., 2008; Arnold et al., 2007). Les cellules de souris (NS0) possèdent l'enzyme  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase qui ajoute un groupe  $\alpha$ 1,3-Gal $\beta$ 1,4-GlcNAc qui n'est pas exprimée chez l'humain, causant ainsi une réaction immunitaire (Jenkins et al., 1996). De plus, dans les cellules de souris, une variante des acides sialiques est présente (N-glycolylneuraminic) à environ 50 % contrairement à 5-15 % dans les cellules CHO et 0 % chez les humains (Baker et al., 2001; Hokke et al., 1995). Pour un même organisme, les niveaux d'enzymes fonctionnelles pour la glycosylation peuvent varier dépendamment du tissu d'où provient la lignée cellulaire (Hossler et al., 2009). Certaines études ont démontré qu'en surexprimant certaines enzymes, il était possible d'obtenir



(ou du moins enrichir) un patron de glycosylation souhaité (Naso et al., 2010; Raymond et al., 2015)

### 2.3.5.2 Milieu de culture

Le milieu de culture des cellules comporte plusieurs éléments qui peuvent influencer le métabolisme cellulaire. Parmi ceux-ci, on retrouve notamment des sucres, des ions, des hormones, des acides aminés et les autres composants du sérum. Cette sous-section portera sur les composés pouvant influencer la glycosylation, tel que mis en évidence dans la littérature.

#### 2.3.5.2.1 Sérum

Il est préférable, lors de production de molécules thérapeutiques, d'éviter l'ajout de sérum afin d'obtenir un produit similaire à chaque culture (Geigert, 2004; Serrato et al., 2007). L'effet du sérum sur la glycosylation est mitigé. D'après Patel et collègues, la production d'immunoglobulines à partir de cellules de souris cultivées sans sérum cause un plus faible niveau de sialylation et un plus haut niveau de galactosylation comparativement à la même lignée cultivée en présence de sérum (Patel et al., 1992). Il est à noter cependant que Serrato et son équipe ont plus récemment obtenu le résultat inverse en produisant aussi des anticorps à partir de cellules de souris (Serrato et al., 2007).

#### 2.3.5.2.2 Ions

Les ions permettent de catalyser les réactions enzymatiques présentes dans les voies de la glycosylation. Ils sont présents dans le milieu de culture traditionnel, mais l'impact d'un ajout plus important dans le milieu de culture quant à la glycosylation a été testé. L'ajout de manganèse a permis d'augmenter le niveau de galactosylation tout comme la quantité de sites ayant été O-glycosylés et N-glycosylés sur l'érythropoïétine recombinante (Crowell et al., 2007). Une seconde étude portant sur la glycosylation de la t-PA (*tissue plasminogen activator*) a permis d'aboutir aux mêmes conclusions (Gawlitze et al., 2009). Par ailleurs, une absence de manganèse dans la culture inhibe la glycosylation (Kaufman et al., 1994). Ainsi, il est évident que le manganèse joue un rôle significatif au niveau des modifications post-traductionnelles. De plus, des études ont démontré que d'autres ions tels que le fer, le magnésium ainsi que le calcium influencent la réaction enzymatique de l'oligosaccharyltransferase (OST) (Hendrickson and Imperiali, 1995; Kaufman et al., 1994). Une étude conclue que la présence de calcium était essentielle dans le RE, afin de

permettre le repliement de la protéine et donc indirectement influencer la glycosylation. (Braakman et al., 1992). Le rôle de ces ions dans les voies métaboliques de la glycosylation n'est pas encore clair ; à ce jour, seule la démonstration de leur influence a été faite.

#### 2.3.5.2.3 *Glucose/Glutamine*

L'importance du glucose et de la glutamine sur le métabolisme cellulaire est bien connue. Ces molécules influencent plusieurs voies métaboliques, dont le processus de la glycosylation (Butler, 2005). En produisant l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) dans les cellules CHO, il a été prouvé qu'en maintenant de faibles concentrations de glutamine et de glucose, le niveau de sialylation diminue et la quantité de mannose présent augmente (Chee Fung Wong et al., 2005; Wong et al., 2005). En produisant la même molécule en CHO avec de faibles concentrations de glucose, une équipe a montré que IFN- $\gamma$  était non glycosylé (Hayter et al., 1992). Villacrés a obtenu un résultat similaire en produisant un anticorps dans les cellules CHO (Villacrés et al., 2015). La majorité des AcM étaient non glycosylés et les autres étaient faiblement galactosylés et sialylés. Contrairement à ce qui a été observé par l'équipe d'Hayter et Villacrés, le groupe de Cruz a constaté que la production de la protéine de fusion IgG-IL2 dans les cellules BHK-21, sous des conditions limitantes de glucose et de glutamine, n'influence pas la composition des oligosaccharides sur les sites de glycosylation (Cruz et al., 2000). La cellule hôte ou encore la glycoprotéine produite sont possiblement la cause de cette différence de résultats entre les deux équipes. Une autre étude montre qu'une diminution de la glutamine dans le milieu a pour effet de diminuer la sialylation, la fucosylation ainsi que le niveau de branchement (Burleigh et al., 2011).

Une analyse des flux métaboliques a corrélié le manque de glutamine à une diminution de la présence de glucosamine. Une trop faible concentration de glucose présent affecte la présence d'UTP. Or, cette dernière molécule et la glucosamine sont des précurseurs afin de former UDP-GlcNAc qui est impliqué dans les voies de la glycosylation (Nyberg et al., 1999) L'influence réelle du glucose et de la glutamine n'est pas complètement élucidée. Les résultats portent à croire que c'est un ensemble de facteurs qui modifient la glycosylation et non pas uniquement l'ajout ou absence de ces deux composés.

#### 2.3.5.2.4 Précurseurs de la glycosylation

Un haut niveau intracellulaire d'UDP-GlcNAc a pour effet d'augmenter le niveau de branchement du profil de glycosylation dans les cellules CHO et BHK, ce qui n'est pas le cas pour les cellules NS0 (Baker et al., 2001; Gawlitzek et al., 1998). Pour les trois types cellulaires, une haute concentration de l'UDP-GlcNAc a pour effet de diminuer le niveau de sialylation. Le même phénomène se produit lorsque le glucose est remplacé par GlcNAc dans le milieu de culture (Tachibana et al., 1996). L'ajout de galactose (jusqu'à 20 mM) dans une culture de CHO produisant l'interleukine 4 n'a eu aucune influence sur la sialylation, ce que les auteurs de l'étude ont expliqué par une activité accrue des sialydases (Clark et al., 2005). Cependant, pour des cellules de souris, l'utilisation de 10 mM de galactose a conduit à une augmentation de plus de 5 % de la galactosylation d'un IgG (Hills et al., 2001). L'ajout de 20 mM de ManNAc dans une culture NS0 et CHO pour produire la protéine TIMP-1 n'a eu aucun effet sur le branchement ou le niveau de sialylation (Baker et al., 2001). Cependant, la même concentration de ManNAc ajoutée à une culture NS0 pour produire IgG a eu pour effet de diminuer d'environ 10 % la galactosylation (Hills et al., 2001). De plus, le groupe de recherche de Gu et Wang a étudié une plage de concentration de ManNAc (jusqu'à 40 mM) et ont obtenu jusqu'à 15 % d'augmentation de sialylation sur l'IFN- $\gamma$  en utilisant des cellules CHO (Gu and Wang, 1998). Ces résultats permettent de poser l'hypothèse que le type cellulaire et/ou une concentration supérieure à 20 mM de ManNAc influencent la glycosylation.

#### 2.3.5.3 Déchets métaboliques

Il a été démontré par plusieurs groupes que le niveau d'ammoniac/ammonium présent dans le milieu de culture diminue le pourcentage de sialylation (Aghamohseni et al., 2014; Andersen and Goochee, 1994; Yang and Butler, 2000). Les ions ammonium augmentent le pH, ce qui inhibe certaines enzymes présentes dans l'appareil de Golgi (Valley et al., 1999). De plus, les ions  $\text{NH}_4^+$  favorisent la production d'UDP-GlcNAc ce qui pourrait expliquer la diminution en acide sialique.

#### 2.3.5.4 Température

La température de culture influence l'activité enzymatique à l'intérieur de la cellule. Deux équipes ont produit des glycoprotéines différentes dans les cellules CHO en diminuant la température de culture. Les deux ont démontré que le profil de glycosylation n'est pas modifié et

la quantité de protéine produite est augmentée (Bollati-Fogolin et al., 2005; Clark et al., 2004). La phosphatase alcaline sécrétée (SeAP, une protéine recombinante modèle) est aussi produite en plus grande quantité dans les cellules CHO à plus faible température, mais le profil de glycosylation est différent lorsque la température de culture est diminuée (Kaufmann et al., 1999). L'effet de la température sur la glycosylation n'est donc pas évident à prédire.

### **2.3.5.5 pH du milieu de culture**

Le pH du milieu de culture influence le pH intracellulaire et par le fait même l'activité des enzymes impliquées dans la glycosylation. De façon générale, le pH dans le RE est de 7,2 et passe de 6,7 à 6 dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi (Casey et al., 2010). Il a été montré qu'une élévation du pH du milieu de culture réduit l'activité de certaines enzymes telles que la galactosyltransférase et la sialyltransférase (Gawlitsek et al., 2009; Yoon et al., 2005). De plus, le pH influence le transport du précurseur UDP-GlcNAc dans l'appareil de Golgi (Waldman and Rudnick, 1990).

### **2.3.5.6 Oxygène dissout**

L'oxygène dissout (OD) dans le milieu de culture a une influence sur plusieurs facteurs, dont les réactions enzymatiques liées au métabolisme cellulaire et par conséquent la glycosylation (Restelli et al., 2006). Kunkel et collègues ont constaté qu'en diminuant l'oxygène présent pour une culture de cellules provenant de souris, la galactosylation des IgG produites diminuait (Kunkel et al., 1998). En hypoxie, la sialylation varie significativement pour l'hormone folliculostimulante (*Follicle stimulating hormone* – FSH) produite alors que peu de changements ont été notés pour la production de t-PA (Chotigeat et al., 1994; Lin et al., 1993). Puisque les deux protéines sont produites dans les cellules CHO, ceci porte à croire que la disparité entre les résultats est causée par les différences de structure qui existent entre protéines. L'équipe de Butler a proposé que dans le cas d'un anticorps, la DO puisse influencer le moment auquel se forment les ponts disulfures entre les chaînes lourdes et légères, ce qui cause un encombrement stérique empêchant la galactosylation du Fc (Butler, 2006).

### **2.3.5.7 Potentiel d'oxydoréduction**

Il est connu que le potentiel redox dans le RE influence la formation de ponts disulfures sur la protéine, qui à leur tour affecte la structure tridimensionnelle de la protéine. Ainsi, si le pont ne

se fait pas correctement, la glycosylation sera influencée (Braakman et al., 1992; Feige and Hendershot, 2011).

Ces études ont majoritairement été réalisées en erlenmeyers. L'utilisation d'un bioréacteur permettrait de mieux contrôler tous les paramètres de culture qui peuvent influencer la glycosylation, comme le pH et l'oxygène (voir plus haut) ; il est donc difficile de comparer les résultats publiés. Par ailleurs, pour certaines études, du sérum a été ajouté au milieu de culture, ce qui complexifie d'autant plus l'interprétation de ces travaux. Il semble donc que le contrôle de la glycosylation d'une protéine soit du cas par cas et qu'il faille optimiser chaque procédé (Fan et al., 2015).

### **2.3.6 Analyse des profils de la glycosylation**

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour analyser les patrons de glycosylation des protéines. En analysant par SDS-PAGE et en colorant les protéines produites au bleu de Coomassie, il est possible d'obtenir une évaluation globale de l'état de la glycosylation de la protéine en déterminant son poids moléculaire. Il est aussi possible de déterminer si un oligosaccharide est présent sur la chaîne en effectuant un *Lectin blot*. Cet essai est une adaptation du *Western Blot*, en employant une lectine qui aura une affinité pour un glycan particulier. Cet essai à l'avantage d'être rapide, mais ne permet pas d'établir le profil complet de la glycosylation. Une des techniques couramment employée pour analyser les profils de glycosylation complet est la spectrométrie de masse et c'est cette technique qui a été utilisée pour l'analyse des anticorps dans le cadre de cette thèse.

#### **2.3.6.1 Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (MS) permet de séparer et d'analyser des biomolécules par leur masse ( $m$ ) et leur charge ( $z$ ). D'abord, les ions passant dans le champ électrique avanceront et ces molécules chargées subiront une force permettant ainsi la séparation (Cooper, 2004). L'appareil comprend trois parties distinctes soient l'ioniseur, l'analyseur et le transformateur. Pour commencer, l'échantillon à analyser est vaporisé et ionisé par la source d'ionisation du système. Cette source peut être utilisée en mode positif ou négatif dépendamment des résultats recherchés et de la source utilisée. Par la suite, l'échantillon est amené dans la section qui permet la séparation

des ions selon le ratio  $m/z$ . Il existe différents types d'analyseur qui offre différentes résolutions. Finalement, le flux d'ions est transformé en signal électrique afin d'être retransmis à un ordinateur pour évaluer leur abondance (Cooper, 2004; Gross, 2011).

#### 2.3.6.1.1 Sources d'ionisation

Il existe différentes sources d'ionisation possible pour la spectrométrie de masse et seront discutées brièvement. Dans la méthode de bombardement d'atome rapide (FAB), l'échantillon est dilué dans du glycérol afin d'augmenter la viscosité. Par la suite, l'échantillon sera bombardé par un flux d'atomes ou d'ions. Ceci aura pour effet de pulvériser les molécules de l'échantillon en plus d'ioniser une portion de celles-ci. Le nuage d'ions est ensuite envoyé vers la chambre d'analyse du MS. Cette méthode est utilisée principalement pour les peptides et petites protéines ( $\leq 10$  kDa) (Cooper, 2004; Gross, 2011). La méthode ionisation par électronébulisation (ESI) consiste à faire entrer l'échantillon dilué dans un capillaire afin de produire de fines gouttelettes. Le capillaire peut être soumis à un voltage rendant ainsi les gouttelettes chargées. Un flux de gaz sec permet l'évaporation du solvant, laissant ainsi seulement les particules chargées se diriger vers la chambre d'analyse. Cette technique d'ionisation est appropriée pour les macromolécules comme les IgG (Cooper, 2004). La désorption-ionisation par impact laser assisté par matrice (MALDI) consiste tout d'abord à introduire l'échantillon dans une matrice solide qui absorbe la lumière ou les ultraviolets (UV). Afin de désorber les molécules de la matrice, un pulse de laser est émis à la surface de cette dernière. L'énergie absorbée sur la matrice produira un point de chauffage local permettant ainsi la désorption des molécules et permettra l'ionisation. Les molécules seront ensuite envoyées vers la chambre d'analyse de la MS. La méthode MALDI est une technique douce et appropriée pour l'analyse des biomolécules comme les protéines. Plus récemment, cette méthode d'ionisation a été l'objet de plusieurs études, notamment pour l'analyse des glycoprotéines (Dorion-Thibaut et al., 2014; Hanisch, 2012; Ongay et al., 2009; Yamada et al., 2010).

Il est important de noter que la charge des glycans peut avoir une influence sur l'analyse si celle-ci est effectuée en mode positif ou négatif avec la méthode MALDI. Par exemple, l'acide sialique n'est pas détecté en mode positif alors que les sucres neutres comme le galactose et fucose ne seront pas détectés en mode négatif. Cette contrainte est éliminée lorsqu'on effectue l'ionisation de l'anticorps complet (et non seulement le glycan comme avec la méthode MALDI) par ESI, car l'effet des charges de l'acide sialique est diminué.

### 2.3.6.1.2 *Analyseurs*

Il existe différents types d'analyseurs pour la MS, mais celle qui est principalement utilisée avec est le temps de vol (TOF). Avec le TOF, un pulse d'ion est apporté dans un tube non chargé et le temps que l'ion prend à traverser ce tube jusqu'au détecteur est compté. Il est défini que le temps de vol est inversement proportionnel à la vitesse des ions et la vitesse est dépendante du ratio  $m/z$ , d'où la séparation des différents ions (Gross, 2011). Il existe aussi un analyseur quadripolaire qui consiste à séparer les ions dans un champ électrique non uniforme, causant ainsi une oscillation complexe des ions. À un certain voltage et fréquence, seulement les ions d'un ratio  $m/z$  donné seront en mesure de passer au travers de ce champ pour atteindre le détecteur. D'autres variantes de l'analyseur quadripolaire existent soient la résonance cyclotron et la capture d'ions (Cooper, 2004).

## 2.4 Détection par résonance plasmonique de surface

Il existe plusieurs techniques analytiques permettant de mesurer les cinétiques d'interaction entre deux molécules ; elles peuvent être divisées en deux catégories: en solution ou à la surface d'un biocapteur. En utilisant la première approche, dans la plupart des cas, il est nécessaire de marquer une ou les deux molécules afin de mesurer les cinétiques. Parmi ces techniques, on retrouve, entre autres celles basées sur la radioactivité, le transfert de résonance énergétique par fluorescence (FRET), le dichroïsme circulaire et l'absorbance (Day et al., 2002; Miclet et al., 2016; Schaap et al., 2016). La deuxième approche consiste à suivre les interactions entre une molécule attachée à la surface d'un biocapteur (le ligand) et son partenaire en solution (l'analyte). Un biocapteur est un outil analytique composé d'un récepteur et un transducteur permettant de détecter et transformer le signal reçu suite à la formation d'un complexe. Lors d'une interaction, le biocapteur détecte les changements physico-chimiques à la surface de celui-ci. On retrouve trois types de biocapteurs principalement utilisés dans la littérature : les microbalances à cristal de quartz (QCMB), les biocapteurs dont la détection est basée sur les ondes acoustiques de surface (SAW) ou encore sur la résonance plasmonique de surface (SPR) (Altschuh et al., 1992; Prakrankamanant, 2014; Voiculescu and Nordin, 2012). Les biocapteurs SPR présentent de nombreux avantages comparativement à leurs compétiteurs puisqu'ils permettent de détecter de très faibles quantités de matière à leur surface, ils utilisent de faibles volumes d'échantillon (de 10 à 100  $\mu\text{L}$ ).

Dans le cadre de cette thèse, un instrument dont le principe de détection est la SPR (technologie Biacore™) a été utilisé pour mesurer les interactions entre les anticorps monoclonaux et les récepteurs Fcγ. L'utilisation de ce biocapteur ne nécessite pas le marquage des molécules étudiées et permet de suivre en temps réel l'interaction analysée. Il est donc possible d'effectuer des mesures cinétiques et thermodynamiques avec ce type d'instrument. De plus, le biocapteur SPR permet de travailler avec un large spectre de molécule allant des plus petites (200 Da) aux macromolécules (Karlsson, 2004; Van Regenmortel and Choulier, 2001). Cet avantage majeur permet l'étude de différents systèmes comme les interactions anticorps/antigène, ligand/récepteur, protéine/peptide, petites molécules, protéines/lipides, protéines/oligonucléotides, etc.

## **2.4.1 Principe de la résonance plasmonique de surface et architecture des biocapteurs Biacore™**

Trois éléments distinguent la technologie Biacore™ des autres biocapteurs sur le marché: le principe optique de l'appareil, le système microfluidique ainsi que la surface d'étude (Schasfoort and Tudos, 2008). Ces trois caractéristiques font de ces appareils les meilleurs vendeurs sur le marché des biocapteurs malgré leur prix élevé et c'est la raison pour laquelle nous avons travaillé avec ce système.

### **2.4.1.1 Système optique**

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique passe au travers d'un matériau d'indice de réfraction  $n_1$  (ex. du verre) en contact avec un milieu d'indice de réfraction  $n_2$  (ex. une solution aqueuse), selon la loi de Snell-Descartes, si l'angle incident est supérieur à l'angle critique, il est possible d'observer le phénomène de la réflexion totale interne à l'interface (Goudjdamy et al., 2002). Cependant, si un fin film métallique est déposé à la surface du verre (ex. de l'or), la réflexion du faisceau ne sera pas totale. En effet, une portion de la lumière incidente sera « perdue » dans le film métallique. Par ailleurs, il existe un angle supérieur à l'angle critique pour lequel cette « perte lumineuse » sera à son maximum. Cet angle est communément appelé l'angle SPR puisqu'à cet angle précis, l'énergie de la lumière sera complètement convertie en énergie permettant l'oscillation des électrons présents dans le métal (plasmon), d'où le terme détection par résonance des plasmons de surface. Une onde évanescente électrique est associée aux plasmons, dans le cas des biocapteurs que nous avons utilisés, elle pénètre dans le liquide sur une distance d'environ 300



nm (Figure 2-16 A). Conséquemment, la fréquence de résonance associée aux électrons du métal dépend de l'indice de réfraction du milieu étudié, puisque la variation de cet indice perturbera l'onde évanescente et par le fait même l'angle SPR (Figure 2-16 B) (Biacore, 1998; De Crescenzo et al., 2008; Schasfoort and Tudos, 2008; van der Merwe, 2003). Il est important de noter que mis à part l'indice de réfraction du milieu expérimental, la température est un paramètre qui peut influencer l'angle SPR. C'est pourquoi la température sur les instruments utilisés est contrôlée à 0,1 °C près (Biacore, 1998).

Afin de mieux comprendre comment l'indice de réfraction du système étudié peut varier, il est possible de comparer deux valeurs trouvées dans la littérature. Par exemple, un milieu aqueux salin traditionnel aura un indice de réfraction proche de 1,0 alors que lorsque des protéines sont adsorbées la surface du biocapteur, l'indice de réfraction du liquide près de la surface peut augmenter jusqu'à 1,33 de façon proportionnelle à la masse accumulée (van der Merwe, 2003). L'utilisation d'un photodétecteur est nécessaire pour mesurer les petites variations de l'angle SPR. Il est possible de corréler l'accumulation de matière sur la surface (et donc le changement local d'indice de réfraction) et la variation de l'angle SPR (Figure 2-16). Les sensogrammes sont le plus souvent présentés en unités de résonance (Resonance Unit, RU) et la conversion utilisée est de 1 RU pour une variation de  $10^{-4}$  degrés. Des essais sur une surface recouverte d'une matrice de dextran carboxyméthylé mesurant environ 100 nm d'épaisseur ont démontré qu'une réponse de 1000 RU correspondait à 1 ng de protéine/mm<sup>2</sup> à la surface (Biacore, 1998; Schasfoort and Tudos, 2008; van der Merwe, 2003).

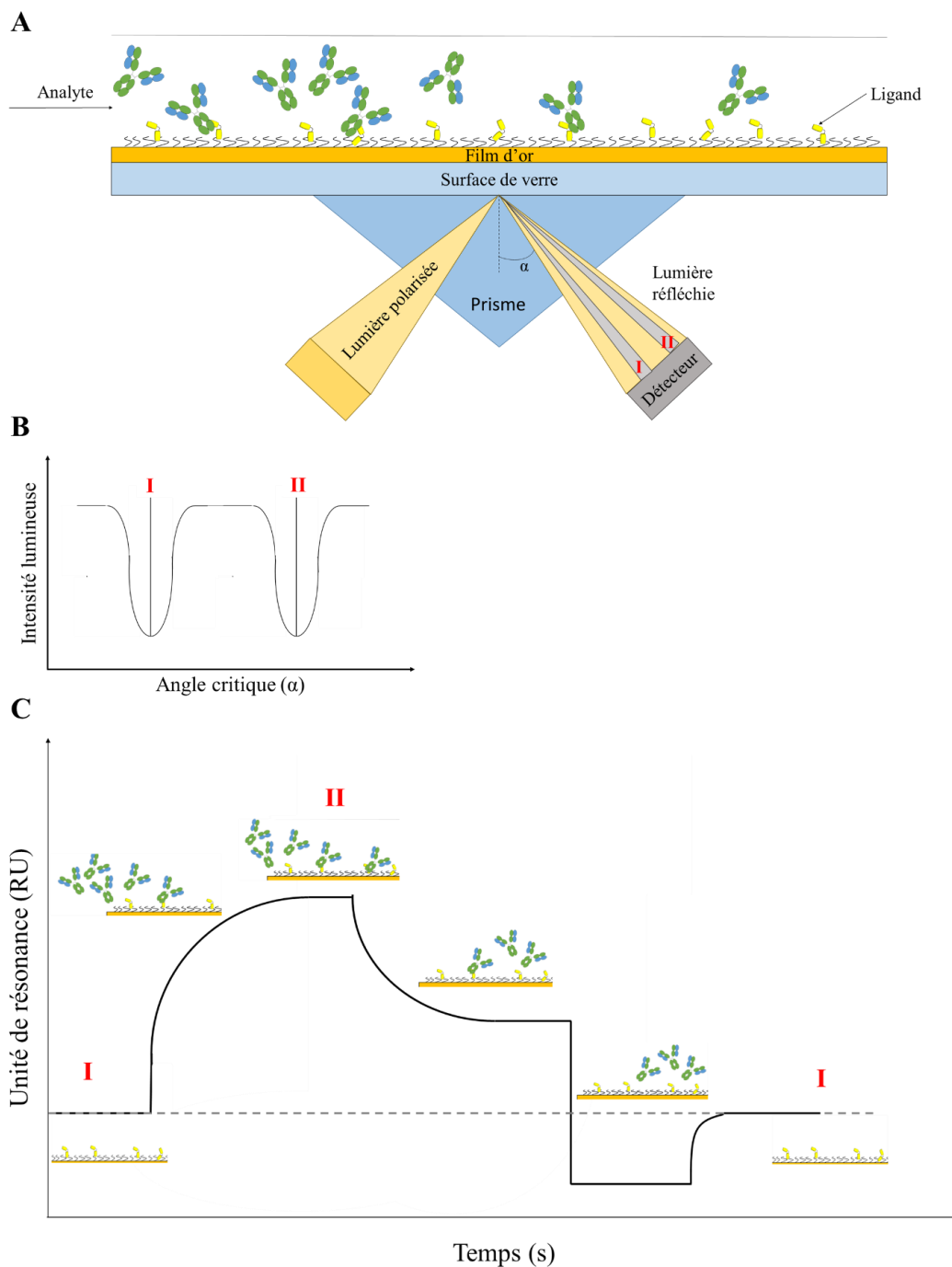


Figure 2-16 : (A) Schématisation d'un système optique d'un instrument Biacore™ afin d'enregistrer les cinétiques d'interaction entre l'analyte (anticorps) et le ligand (récepteur jaune). (B) Changement de l'angle critique de la lumière incidente lorsque des molécules s'accumulent ou se dissocient de la surface. (C) Sensogramme montrant la réponse SPR en fonction du temps lors d'une expérience typique.

Lors d'une expérience typique, un ligand est préalablement immobilisé sur une surface du biocapteur (voir section 2.4.1.3). L'analyte, c'est-à-dire le partenaire en solution, est injecté de manière continue au-dessus de la surface de ligand et d'une surface contrôle et il est possible de suivre en temps réel son accumulation sur les deux surfaces. Par soustraction, on déduit l'accumulation spécifique correspondant à son interaction avec son partenaire biologique immobilisé (Figure 2-16 C). Cette étape représente la phase d'injection (improprement nommée phase d'association dans la majorité des articles de revue puisque la dissociation des complexes formés a aussi lieu lors de l'injection d'analyte). À la fin de cette phase, on injecte alors une solution tampon afin d'enregistrer la dissociation des complexes formés précédemment (phase de dissociation). S'il reste toujours des molécules associées au ligand à la fin de la phase de dissociation, il est possible de régénérer la surface en changeant le pH, la salinité ou encore en ajoutant des agents chaotropes à la solution tampon injectée (phase de régénération) sans toutefois dénaturer ou inactiver le ligand à la surface.

#### **2.4.1.2 Système microfluidique**

La cartouche micro-fluidique intégrée (IFC, Figure 2-17A) des instruments Biacore permet de contrôler le flux de liquide transporté de manière continue sur la surface expérimentale grâce à son réseau de quatre canaux (Figure 2-17B). L'IFC est contrôlée par des pompes et des valves qui permettent de diriger les débits vers les canaux désirés pour l'analyse. L'ajustement des débits et la direction des flux se font via l'ordinateur relié à l'instrument (Biacore, 1998). Par ailleurs, il est aussi possible de contrôler la température à laquelle l'interaction a lieu (4 - 45 °C) (Biacore, 1998). Cette particularité permet à l'utilisateur d'effectuer une étude thermodynamique en plus des essais cinétiques.

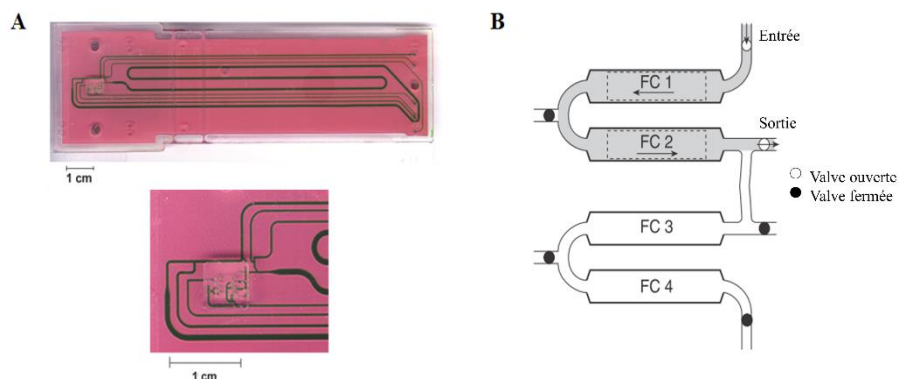


Figure 2-17: Système micro-fluidique du système Biacore™. Adapté de Biacore (1998)

### 2.4.1.3 Immobilisation des protéines sur les surfaces

Le choix de la surface ainsi que la méthode d'immobilisation sont deux éléments très importants pour le design d'une expérience optimale, puisqu'ils permettront l'analyse des molécules étudiées. La puce insérée dans l'instrument consiste en une surface de verre recouverte d'un film d'or. À cette surface métallique est attachée, de façon covalente, une matrice sur laquelle il sera possible de fixer des molécules biologiques. Dépendamment de la puce choisie pour l'expérience, il sera possible d'immobiliser le ligand de façon covalente, par affinité ou encore par liaison hydrophobe. La surface la plus utilisée est recouverte d'une matrice de dextran carboxyméthylé permettant l'immobilisation par liaisons covalentes. De plus, cette matrice a été adoptée par la compagnie puisqu'elle diminue les possibilités d'adsorption non spécifique à la surface. (Biacore, 1998; Healthcare, 2012).

#### 2.4.1.3.1 Méthodes d'immobilisation

Plusieurs méthodes d'immobilisation du ligand sont possibles sur les surfaces recouvertes de dextran carboxyméthylé. Cependant, seules celles applicables dans le cadre de ce projet seront abordées.

Il est d'abord possible d'immobiliser de manière covalente la protéine jouant le rôle de ligand à la surface de dextran carboxyméthylé par ses groupements amines. Cette immobilisation est

considérée comme « non orientée » puisque l'attachement de la protéine à la surface peut s'effectuer via n'importe quel groupement amine disponible sur la protéine (N-terminal et chaînes latérales des résidus lysine). Cette méthode présente l'avantage d'être simple puisqu'elle requiert peu d'étapes (Figure 2-18). Pour ce faire, l'utilisation d'un mélange de 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide/N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS) permet d'activer le groupement carboxyl à la surface de la matrice afin d'obtenir un ester succinimide. Le ligand est ensuite injecté et les groupements ester réagissent spontanément avec les amines primaires du ligand par création de liaison covalente. Cette technique présente un désavantage majeur dans le cas des protéines présentant plusieurs groupements amines : à partir d'une population homogène de protéines en solution, il est possible de créer une surface sur laquelle les protéines sont couplées de façon hétérogène. Cette approche peut en effet créer des populations de protéines inactives ou dont les propriétés d'interaction sont altérées si les amines utilisées pour le couplage étaient proches du site de liaison de la protéine avec l'analyte.

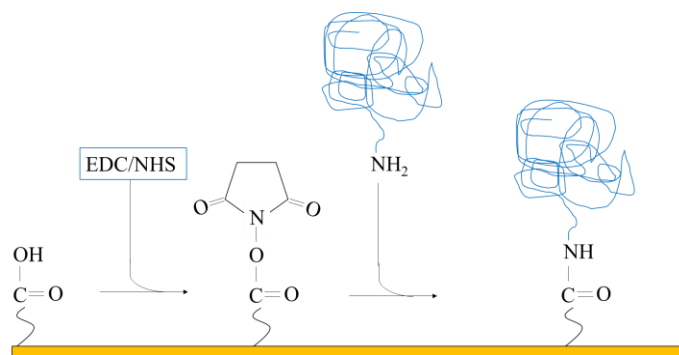


Figure 2-18: Schématisation de l'immobilisation d'une protéine (bleu) via le groupement amine à la surface de dextran carboxyméthylé

Pour éviter cet artéfact, il est possible d'immobiliser le ligand de façon indirecte, c'est-à-dire par une étape de capture. Cette méthodologie permet de présenter le ligand de façon orientée et donc homogène, mais requiert une étape supplémentaire. Par exemple, il est possible d'immobiliser de façon covalente un anticorps ayant une affinité pour une séquence de résidus histidine, permettant ainsi à un ligand ayant une étiquette histidine d'être capturé à la surface par l'anticorps préalablement immobilisé. Par contre, il est essentiel que l'affinité entre l'agent permettant la capture et le ligand soit haute et que l'interaction soit stable.

Un autre type de surface est aussi disponible depuis 2013 et utilisée dans le cadre de ce projet afin de capturer le ligand. Il s'agit d'une surface de dextran carboxyméthylé sur laquelle est attaché un simple brin d'ADN. Une première injection du brin complémentaire d'ADN lié à une molécule de streptavidine est effectuée puis le ligand biotinylé est injecté afin de le recruter par interaction biotine/streptavidine. Cette technique permet de capturer de façon stable le ligand puisque la liaison biotine-streptavidine est très forte ( $K_D \approx 10^{-14}$  M)(Dundas et al., 2013). De plus, cette méthodologie permet de régénérer aisément la surface en dissociant le complexe d'ADN double brin en utilisant la solution de régénération fournie par le fabricant.

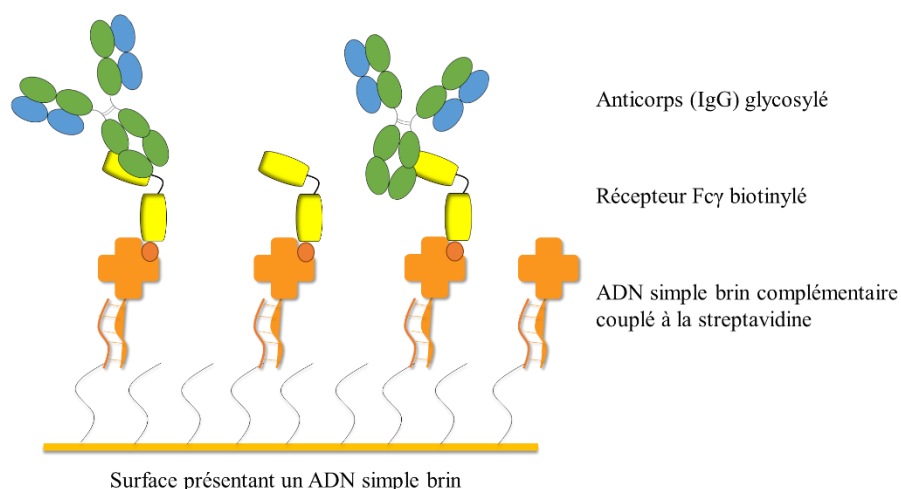


Figure 2-19: Schématisation de la capture d'un ligand biotinylé

#### 2.4.1.3.2 Surface de référence

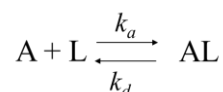
L'utilisation d'une surface de référence lors d'une expérience est essentielle afin d'éliminer les artéfacts comme les interactions non spécifiques, l'effet matriciel, les perturbations physiques et électriques (ex. déplacement de l'aiguille permettant la prise des divers échantillons) ainsi que le changement d'indice de réfraction en début de cycle causé par l'injection d'une autre solution (Myszka, 1999). Afin d'obtenir les résultats les plus précis possible, il faut traiter la surface de la même manière que la surface active (celle où le ligand est présent). Grâce au système micro-fluidique, il est possible de suivre en temps réel l'accumulation de matériel sur les quatre surfaces correspondantes aux canaux de l'appareil. Par la suite, le logiciel peut soustraire la réponse obtenue sur la surface de référence aux trois autres surfaces actives. Cependant, une déviation propre à chaque cellule peut être observée. Afin de contrer cet effet, il est hautement suggéré d'injecter une

solution tampon sur chaque surface et d'en soustraire la réponse. Cette approche est couramment nommée « double référenciation » dans le jargon des biocapteurs SPR (Rich and Myszka, 2000).

## 2.4.2 Limitation par transfert de masse ou par cinétiques biologiques

Afin de déterminer les constantes cinétiques d'une interaction, différents modèles mathématiques peuvent être utilisés dépendamment du système étudié. Dans le cadre de ce projet, un modèle simple de Langmuir (interaction 1 :1) a été utilisé. Cette section présente brièvement les équations de base à résoudre pour trouver les constantes cinétiques d'interaction entre les deux partenaires en solution.

En supposant un modèle d'interaction simple entre un analyte (A) et un ligand monovalent (L) pour former un complexe (AL),



La variation par rapport au temps des complexes peut donc s'exprimer par :

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_a * [A] * [L] - k_d * [AL]$$

Où  $k_a$  et  $k_d$  correspondent aux constantes cinétiques d'association et de dissociation des complexes.

En adaptant l'équation différentielle en fonction de la réponse SPR (RU), on obtient :

$$\frac{dR}{dt} = k_a * [A] * (R_{Max} - R) - k_d * R$$

Où R est la réponse enregistrée qui correspond à l'accumulation de A (donc à la formation de complexes AL sur la surface) et  $R_{max}$  représente la réponse maximale théorique correspondant à la saturation de la surface (toutes les molécules de ligand sont associés à des analytes).

Dans le cas d'un modèle simple d'interaction comme celui-ci, il est possible d'intégrer analytiquement l'équation différentielle précédente

$$R = \frac{k_a * A * R_{Max} * (1 - e^{-(k_a * A + k_d) * t})}{k_a * A + k_d} \quad \text{si } [A] > 0$$

$$\text{et } R = R_{injection} e^{(-k_d * (t - t_{injection}))} \quad \text{si } [A] = 0$$

$R_{injection}$  est la valeur qui correspond à l'accumulation de A juste avant l'injection de tampon commençant à  $t_{injection}$ .

Il est aussi intéressant de noter qu'à l'équilibre, c'est à dire si l'injection d'analyte conduit à un plateau, alors

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_a * [A] * [L] - k_d * [AL] = 0$$

et donc,

$$k_a * [A] * [L] = k_d * [AL]$$

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A] * [L]}{[AL]}$$

Où  $K_D$  représente la constante thermodynamique de dissociation.

Dans le cas où plusieurs injections d'analyte conduisent à l'obtention de plateaux, il est possible d'utiliser ces valeurs pour déduire  $K_D$  en transformant l'équation précédente en :

$$R_{plateau} = R_{Max} * \frac{[A]}{K_D + [A]}$$

Où  $R_{plateau}$  correspond à la valeur de la réponse au plateau.

Cependant, les équations différentielles précédentes ne sont utilisables que si le transport diffusif des analytes libres en solution vers la surface est rapide par rapport aux cinétiques biologiques. Par contre, si le processus d'adsorption (ou d'interaction) est rapide à comparer au phénomène de transport, un gradient d'analyte sera présent au-dessus de la surface (Schasfoort and Tudos, 2008).



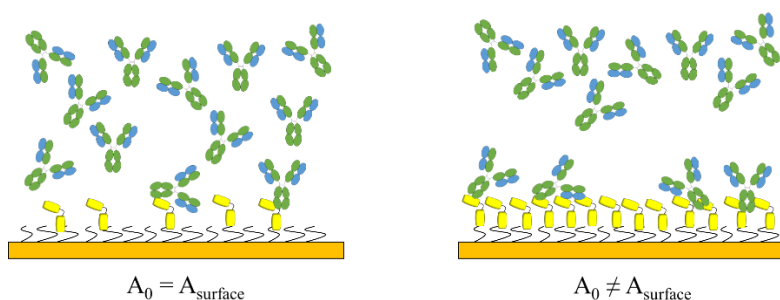
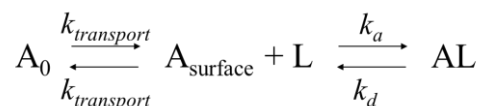


Figure 2-20: Représentation des conditions cinétiques et de la limitation par transfert de masse à la surface d'un instrument SPR

Si le phénomène d'interaction est plus rapide que le phénomène diffusif, un gradient d'analyte est créé. Ce phénomène est appelé limitation par transfert de masse dans le jargon des instruments SPR et il peut être représenté par le schéma réactionnel ci-dessous (Altschuch et al., 2009).



Ainsi, le transport de l'analyte vers la surface sera pris en compte via l'ajout du coefficient de transport ( $k_{transport}$ ). Ce dernier dépend du coefficient de diffusion de l'analyte, de la géométrie du canal de l'instrument et du débit employé durant l'expérience (Glaser, 1993).

Le phénomène de limitation par transfert de masse peut être éliminé ou du moins diminué en augmentant  $k_{transport}$ . Puisque les dimensions de la cellule SPR et le coefficient de diffusion de la molécule ne peuvent changer, il est seulement possible d'augmenter le débit pour affecter  $k_{transport}$ . Si cela n'est pas suffisant, il est aussi possible de diminuer la densité de ligand à la surface afin de diminuer la valeur de  $R_{max}$ . Pour détecter les limitations par transfert de masse, des injections de la même solution d'analyte à différents débits sont effectuées. Si l'accumulation n'est gouvernée que par les interactions biologiques, les sensogrammes enregistrés sont superposables. Si la limitation par transfert de masse ne peut être enrayée par l'augmentation du  $k_{transport}$  ou encore par la diminution du  $R_{max}$ , l'utilisation d'un modèle mathématique tenant compte de ce phénomène peut être mise en place (Myszka et al., 1997). Ce modèle à deux compartiments considère deux zones d'écoulement, une fois le régime permanent établi et l'effet de l'entrée dans la cellule micro-fluidique disparu. Le premier compartiment est loin de la surface où la concentration de l'analyte

(A) est constante et égale à la concentration d'injection et le deuxième est une concentration près de la surface qui varie en fonction du temps.

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_a C_A (\tilde{R}_{max} - \tilde{R}) + k_d \tilde{R} + \tilde{k}_{transport} (C_T - C_A)$$

$$\frac{dR}{dt} = k_a C_A (R_{max} - R) - k_d R$$

$$\text{Où } \tilde{R} = \frac{R}{h}; \tilde{R}_{max} = \frac{R_{max}}{h}; \tilde{k}_{transport} = \frac{k_{transport}}{h}$$

$C_A$  correspond à la concentration de l'analyte près de la surface,  $C_T$  est la concentration de ligand totale et  $h$  correspond à la hauteur de la cellule micro-fluidique. L'équipe de Goldstein a démontré que la valeur de  $h$  n'influence ni les constantes cinétiques ni les données expérimentales. Ainsi, pour simplifier les calculs,  $h$  est fixé arbitrairement à 1 RU/M (Goldstein et al., 1999).

### 2.4.3 Études sur l'interaction anticorps et les FcγRs

Dans la littérature, on retrouve plusieurs études rapportant les cinétiques d'interaction entre les récepteurs Fcγ et les immunoglobulines G. Ces expériences ont été menées afin de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation ( $k_a$  et  $k_d$ ) et/ou la constante thermodynamique de dissociation ( $K_D$ ). Ces valeurs sont d'une grande importance afin de caractériser l'interaction entre les deux partenaires et déterminer l'impact de la modification de l'un d'eux sur l'interaction. En employant les instruments SPR, il a été démontré par plusieurs équipes de recherche indépendantes que l'absence du fucose sur un anticorps glycosylé a un impact notable sur son affinité pour son récepteur CD16a (FcγRIIIa) (Ferrara et al., 2006b; Kanda et al., 2007; Okazaki et al., 2004).

Tel que décrit précédemment, plusieurs techniques d'immobilisation des protéines peuvent être mises en œuvre pour effectuer les expériences. Dans le cas précis du couple anticorps/FcγR, plusieurs approches sont possibles. Tout d'abord, il est possible d'immobiliser de façon covalente l'une des deux protéines. Cette technique d'immobilisation est non orientée ce qui occasionnera

une population hétérogène à la surface de la SPR. L'utilisation d'un agent permettant la capture du ligand permet d'avoir une surface homogène, mais requiert plus de matériel. En effet, à chaque cycle, il est nécessaire de capturer à nouveau le ligand avant d'injecter l'analyte en solution. L'agent capturant varie en fonction du ligand à capturer. Dans le cas d'un IgG, il est possible d'utiliser la protéine A qui a une forte affinité pour la portion Fc de l'anticorps. Il serait aussi envisageable d'utiliser un anticorps ciblant la chaîne légère de l'anticorps étudié comme un anticorps anti-kappa ou anti-lambda, par exemple. L'antigène de l'IgG étudiée serait un excellent agent de capture si l'affinité entre les deux partenaires est suffisamment grande. Cette haute affinité entre l'agent de capture et le ligand est essentielle afin d'avoir une surface *test* stable et homogène et donc de générer des résultats fiables et reproductibles. La capture du récepteur peut s'effectuer via un anticorps ciblant ce dernier, loin du site de liaison avec l'anticorps. De manière générale, plusieurs études se basent sur la capture du récepteur à la surface du biocapteur via un anticorps anti-histidine qui reconnaît une étiquette histidine ajoutée sur le récepteur.

La majorité de ces techniques ont été répertoriées dans la littérature (Tableau 2-2). Plusieurs études utilisent le couplage des amines afin de greffer l'anticorps (majorité des cas) à la surface de la SPR. L'inversion du couple analyte/ligand à la surface du biocapteur a été effectuée majoritairement en utilisant l'anti-histidine comme agent de capture des récepteurs. De plus, les interactions répertoriées ont souvent des cinétiques rapides, ce qui rend difficile le calcul des constantes d'association et de dissociation des complexes. Dans ce cas, l'évaluation de la constante thermodynamique de dissociation ( $K_D$ ) a été déterminée à l'état d'équilibre (plateau) à la fin de l'injection de l'analyte. À la lumière de ces résultats (Tableau 2-2), on constate qu'il y a autant de valeurs de constantes d'association, de dissociation et de constantes thermodynamiques qu'il y a d'expériences répertoriées. D'une étude à l'autre, les méthodologies employées diffèrent tant au niveau de la préparation des protéines que de l'expérience SPR elle-même. En effet, plusieurs publications ne spécifient pas si l'absence d'agrégats a été vérifiée dans les échantillons injectés (Asaoka et al., 2013; Bruhns et al., 2009; Chu et al., 2008; Ferrara et al., 2006b; Galon et al., 1997; Kanda et al., 2007; Kaneko et al., 2006; Maenaka et al., 2001; Mimura et al., 2001; Okazaki et al., 2004; Shibata-Koyama et al., 2009). Un échantillon présentant des agrégats verra ses constantes cinétiques et thermodynamiques affectées puisqu'il est non-homogène et susceptible d'engendrer des situations d'avidité. De plus, la préparation des récepteurs Fcγ utilisés varie ; différentes lignées

cellulaires ont été utilisées, ce qui influence la glycosylation des récepteurs. Or, comme il a été mentionné précédemment, la glycosylation de CD16a influence l'interaction avec la portion Fc de l'anticorps. Par ailleurs, la densité de glycoprotéines immobilisées à la surface du biocapteur varie d'une étude à l'autre, ce qui complexifie la comparaison des résultats. La majorité des publications ne présentent pas le  $R_{\max}$  calculé, valeur importante pour confirmer la qualité des résultats obtenus par rapport au modèle 1:1 (Bruhns et al., 2009; Chu et al., 2008; Ha et al., 2011; Kanda et al., 2007; Kaneko et al., 2006; Luo et al., 2009; Maenaka et al., 2001; Mimura et al., 2001; Okazaki et al., 2004; Richards et al., 2008; Shibata-Koyama et al., 2009; Zeck et al., 2011; Zou et al., 2011). Certaines études ne précisent pas le variant polymorphique de CD16a qui a été employé (Kaneko et al., 2006; Li et al., 2007; Lu et al., 2011; Maenaka et al., 2001; Patel et al., 2013; Radaev and Sun, 2002; Zou et al., 2011) et d'autres études semblent être réalisées en limitation par transfert de masse lorsqu'on inspecte visuellement les sensogrammes obtenus (Galon et al., 1997; Li et al., 2007; Radaev and Sun, 2002). Certains immobilisent le récepteur à la surface alors que d'autres choisissent l'anticorps comme ligand. En temps normal, il est attendu que ces deux approches permettent d'obtenir les mêmes constantes, mais il semble évident que le modèle simple de Langmuir représentant une interaction 1:1 ne soit pas adéquat. D'ailleurs, certaines publications ne montrent pas les courbes modélisées, ce qui ne permet pas de juger adéquatement de la qualité de l'expérience présentée (Chu et al., 2008; Ha et al., 2011; Kaneko et al., 2006; Lu et al., 2011; Richards et al., 2008). Finalement, les expériences menées par trois groupes de recherche présentent une diminution de signal en fin d'injection de l'analyte, ce qui semble être un artéfact de la méthodologie SPR employée (Hayes et al., 2014; Luo et al., 2009; Zeck et al., 2011). Il est à noter que ces trois publications utilisent un anticorps anti-histidine comme agent de capture du récepteur à la surface du biocapteur.

Peu d'articles montrent une analyse SPR et une analyse cellulaire ou *in vivo* de l'ADCC avec le même lot d'anticorps, afin de comparer les résultats. Il est souvent supposé qu'un anticorps ayant une meilleure affinité pour le Fc $\gamma$ RIIIa aura une meilleure efficacité en ADCC. Cependant, des publications montrent que cela n'est pas toujours vrai (Davies et al., 2001; Lin et al., 2015; Yu et al., 2013). L'une des raisons serait l'équilibre qui s'exerce *in vivo* entre les interactions avec les récepteurs activateurs (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa) et le récepteur inhibiteur (Fc $\gamma$ RIIb). Il est aussi probable que l'ADCC soit relié à un paramètre cinétique (constante cinétique d'association ou de dissociation) plutôt que thermodynamique ( $K_D$ ).

Par ailleurs, aucune publication ne présente le développement d'un essai cinétique fiable dont les résultats sont corrélables aux patrons de glycosylation de différents lots d'anticorps monoclonaux.

Tableau 2-2 : Récapitulatif des résultats SPR trouvés dans la littérature

Immobilisation	Ligand	Analyte	$k_a$	$k_d$	$K_D$	Référence
Couplage des amines	IgG1	CD32b	-	-	3,3 $\mu\text{M}$	Mimura et al. (2001)
	IgG1	CD16a	-	-	1,57 $\mu\text{M}$	Maenaka et al. (2001)
		CD32a	-	-	0,69 $\mu\text{M}$	
		CD32b	-	-	1,67 $\mu\text{M}$	
	IgG1	CD16a <sub>V158</sub>	-	-	0,75 $\mu\text{M}$	Ferrara et al. (2006b)
		CD16a <sub>F158</sub>	-	-	5,0 $\mu\text{M}$	
	IgG1 non fucosylé	CD16a <sub>V158</sub>	$2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,024 $\mu\text{M}$	
		CD16a <sub>F158</sub>	$1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$32 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,20 $\mu\text{M}$	
	IgG1	CD16a	-	-	0,2 $\mu\text{M}$	Kaneko et al. (2006)
		CD32b	-	-	2,50 $\mu\text{M}$	
	IgG1 sialylé	CD16a	-	-	1,42 $\mu\text{M}$	
		CD32b	-	-	2,56 $\mu\text{M}$	
	IgG1	CD16a	-	-	85 $\mu\text{M}$	Patel et al. (2013)
		CD32a	-	-	80 $\mu\text{M}$	
		CD32b	-	-	3.1 $\mu\text{M}$	
		CD64	-	-	12 nM	
	IgG1	CD64	$12,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0,32 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,26 nM	Asaoka et al. (2013)
	IgG1	CD16a	-	-	1,5 $\mu\text{M}$	Lu et al. (2011)
		CD64	-	-	20 nM	
	CD64	IgG1	-	-	40 nM	
	CD16a	IgG1	-	-	5 $\mu\text{M}$	Radaev and Sun (2002)
	CD16aV158	IgG1	-	-	1,5 $\mu\text{M}$	Bruhns et al. (2009)
	CD16aF158		-	-	1,5 $\mu\text{M}$	
	CD32a		-	-	4,0 $\mu\text{M}$	
	CD32b		-	-	20 $\mu\text{M}$	
	CD64		-	-	0,065 nM	
	CD16b	IgG	$0,011 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$0,98 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,87 $\mu\text{M}$	Galon et al. (1997)

Capture par Protéine A	IgG1	CD16a	-	-	0,13 $\mu\text{M}$	Zou et al. (2011)
		CD32b	-	-	2,1 $\mu\text{M}$	
	IgG1 non fucosylé, fortement mannosylé	CD16a	-	-	0,045 $\mu\text{M}$	
		CD32b	-	-	3,5 $\mu\text{M}$	
	IgG1	CD16a <sub>V158</sub>	-	-	0,2 $\mu\text{M}$	Chu et al. (2008)
		CD32a	-	-	0,85 $\mu\text{M}$	
		CD32b	-	-	1,8 $\mu\text{M}$	
		CD64	-	-	0,28 nM	
	IgG1	CD16a <sub>V158</sub>	-	-	0,28 $\mu\text{M}$	Richards et al. (2008)
		CD16a <sub>F158</sub>	-	-	1,0 $\mu\text{M}$	
		CD32a	-	-	0,85 $\mu\text{M}$	
		CD32b	-	-	2,3 $\mu\text{M}$	
		CD64	-	-	0,12 nM	
Capture par anticorps	CD16a	IgG1	$0,08 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$5,74 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,71 $\mu\text{M}$	Li et al. (2007)
	IgG1	CD16a <sub>V158</sub>	-	-	7,1 nM	Ha et al. (2011)
		CD16a <sub>F158</sub>	-	-	13,1 nM	
		CD32a	-	-	114 nM	
		CD32b	-	-	260 nM	
		CD64	-	-	0,23 nM	
Capture par anti-histidine	CD32a	IgG	-	-	4,2 $\mu\text{M}$	Hayes et al. (2014) <sup>a</sup>
	CD32b		-	-	6,9 $\mu\text{M}$	
	CD16b	IgG1	-	-	11 $\mu\text{M}$	Luo et al. (2009)
	CD32a		-	-	6,0 $\mu\text{M}$	
	CD64		$6,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$63 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,9 nM	
	CD16a <sub>F158</sub>	IgG1 complexe	-	-	0,53 $\mu\text{M}$	Kanda et al. (2007)
		IgG1 complexe, sans fucose	-	-	0,094 $\mu\text{M}$	

	IgG1 hybride, sans fucose	-	-	0,18 $\mu\text{M}$	
CD16a <sub>V158</sub>	IgG1  IgG1 sans fucose	-	-	0,09 $\mu\text{M}$	Shibata-Koyama et al. (2009)
CD16 <sub>F158</sub>		-	-	0,28 $\mu\text{M}$	
CD16a <sub>V158</sub>		-	-	0,03 $\mu\text{M}$	
CD16 <sub>F158</sub>		-	-	0,06 $\mu\text{M}$	
CD16a <sub>V158</sub>	IgG1	$4,29 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$7,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	17,3 nM	Zeck et al. (2011)
CD16a <sub>F158</sub>	IgG1	$0,34 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$7,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,20 $\mu\text{M}$	Okazaki et al. (2004)
	IgG1 sans fucose	$3,26 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$6,64 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	0,02 $\mu\text{M}$	

<sup>a</sup> Hayes a aussi utilisé les récepteurs CD16a<sub>V158/F158</sub> ainsi que CD64 par SPR et a tiré des conclusions qualitatives



### **Chapitre 3 DÉMARCHE GÉNÉRALE DE L'ENSEMBLE DU PROJET ET ORGANISATION DU DOCUMENT**

Le projet de doctorat, présenté dans cette thèse, fait partie des études menées par le regroupement stratégique de recherche CRSNG « *Strategic Network for the Production of Single-type Glycoform Monoclonal Antibodies (MabNet)* ». Les différents laboratoires de ce regroupement collaborent afin de réussir à produire des anticorps ayant un patron de glycosylation défini au sein d'une même culture. La problématique de la glycosylation des anticorps monoclonaux est bien connue de la communauté scientifique. Entre autres, il a été démontré que l'interaction avec les FcγRs est influencée par la composition du patron de glycosylation des anticorps thérapeutiques. Puisque le traitement de différentes maladies repose sur l'interaction des anticorps monoclonaux injectés aux patients avec les récepteurs Fcγ, il est essentiel de mieux comprendre comment la composition du glycan influence les interactions. Ce projet s'inscrit dans la thématique analytique du groupe de recherche, puisqu'il a pour objectif de développer un essai routinier utilisant un biocapteur de type SPR afin de caractériser les interactions entre les différents anticorps glycosylés ainsi que les récepteurs Fcγ.

Les travaux présentés dans le chapitre 4 de cette thèse ont été publiés dans le journal scientifique « *Journal of Immunological Methods* » en 2014. Ces travaux étudient la possibilité d'utiliser la détection par résonance plasmonique de surface afin de caractériser les interactions entre les FcγRs et des IgGs présentant différents patrons de glycosylation. L'objectif était de produire les domaines extracellulaires des récepteurs CD16a et CD64 afin de les immobiliser sur la surface du biocapteur. Deux approches d'immobilisation pour ces deux récepteurs sont présentées et comparées pour l'élaboration d'un essai fonctionnel. En utilisant le récepteur CD16a, il a été possible de différencier un anticorps non glycosylé et fortement galactosylé par rapport à un anticorps modèle. De plus, l'essai présenté avec CD16a permet de détecter une faible présence d'agrégats dans le lot d'anticorps analysé.

Les travaux présentés dans le deuxième article de cette thèse (Chapitre 5) ont été publiés dans le journal scientifique « *Journal of Molecular Recognition* » en 2016. Ces travaux étudient la possibilité de capturer les récepteurs à la surface de la SPR en utilisant l'interaction biotine/streptavidine. Un protocole de production des récepteurs Fcγ a été développé afin d'obtenir une biotinylation *in-cell*. Lors de l'élaboration de la stratégie de co-transfection, nous avons pris en compte la quantité du plasmide codant pour l'enzyme BirA requise afin d'optimiser le ratio biotinylation versus rendement de production des récepteurs. L'utilisation des quatre récepteurs Fcγ biotinylés à la surface de la SPR a permis de démontrer le potentiel de l'essai pour caractériser les interactions avec les anticorps. Non seulement l'essai SPR est fonctionnel pour les quatre récepteurs, mais il a aussi été possible de différencier un anticorps galactosylé et non glycosylé d'un anticorps modèle avec CD16a et CD64.

Le chapitre suivant présente une application directe de la méthodologie publiée dans le deuxième article, grâce à une collaboration au sein du réseau MabNet. Ces résultats seront soumis pour publications dans les prochaines semaines. Huit anticorps présentant différents profils de glycosylation ont été produits et analysés par SPR et par ADCC avec le récepteur FcγRIIIa<sub>V158</sub>. Les résultats obtenus par les deux techniques sont en parfait accord, validant ainsi la technique développée.

Dans le troisième article (Chapitre 7), soumis pour publication dans le journal scientifique « *Journal of immunological methods* », l'approche utilisant l'interaction biotine/streptavidine est utilisée afin de faire un suivi hors-ligne d'une culture CHO produisant un IgG. L'objectif était de démontrer que l'essai SPR élaboré préalablement permettait non seulement de quantifier l'anticorps dans le surnageant de la culture, mais aussi de démontrer qu'en une seule expérience il est possible de confirmer la bioactivité de l'anticorps pour la portion ayant une affinité avec le récepteur Fcγ et son antigène. La quantification de l'IgG dans le surnageant a été réalisable en imposant la limitation par transfert de masse avec l'utilisation du récepteur de haute affinité CD64. En normalisant les cinétiques d'interaction entre l'anticorps et l'antigène, il a été possible de prouver que les interactions sont similaires tout au long de la culture. Ces travaux donnent la possibilité d'utiliser CD64 pour faire un suivi en ligne d'une culture en bioréacteur afin d'assurer

l'innocuité du produit et aussi voir les effets de la variation des différents paramètres de culture sur l'anticorps produit.

Les chapitres suivants présentent une discussion générale ainsi qu'une conclusion portant sur la méthodologie développée et utilisée avec le biocapteur SPR afin de caractériser les interactions entre les anticorps et les récepteurs Fc $\gamma$ .

En plus des présentations lors des rencontres MabNet annuelles, les travaux décrits dans cette thèse ont été présentés dans plusieurs conférences notamment à la conférence canadienne de génie chimique en 2012 où nous étions le présentateur invité (*keynote speaker*, CSChE, Vancouver) et lors de deux conférences internationales : *Protein Expression in Animal Cell* en 2013 (Présentation orale et par affiche, PEACe, Kananaskis) et *Cell Culture Engineering* en 2014 (Présentation par affiche, CCE, Québec).

## **Chapitre 4 ARTICLE 1 : DÉVELOPEMENT D'UN ESSAI BASÉ SUR LA DÉTECTION DE LA RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE POUR ÉVALUER LE PATRON DE GLYCOSYLATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX EN UTILISANT LES DOMAINES EXTRACELLULAIRES DE CD16A ET CD64**

### **4.1 Présentation de l'article**

Cette section reprend l'article intitulé « **Towards the Development of a Surface Plasmon Resonance Assay to Evaluate the Glycosylation Pattern of Monoclonal Antibodies Using the Extracellular domains of CD16a and CD64** ». Il a été publié dans la revue *Journal of Immunological Methods* en 2014 (Vol. 408, June 2014, p. 24–34).

Ce manuscrit présente la production et la purification du domaine extracellulaire de deux récepteurs Fcγ, c'est-à-dire CD16a et CD64 par transfection transitoire dans les cellules de mammifère. L'utilisation de ces deux récepteurs, dans un essai analytique visant à contrôler la qualité des anticorps monoclonaux produits, est discutée. Plus spécifiquement, l'article présente un essai utilisant la détection par résonance des plasmons de surface pour l'évaluation du patron de glycosylation et l'état d'agrégation des anticorps monoclonaux. L'approche présentée permet de discriminer les anticorps ayant différents profils de glycosylation et permet de détecter un faible pourcentage d'agrégat dans le lot d'anticorps analysé.

## **4.2 Towards the Development of a Surface Plasmon Resonance Assay to Evaluate the Glycosylation Pattern of Monoclonal Antibodies Using the Extracellular domains of CD16a and CD64**

July Dorion-Thibaudeau<sup>1,2</sup>, Céline Raymond<sup>2,3</sup>, Erika Lattová<sup>4</sup>, Helene Perreault<sup>4</sup>, Yves Durocher<sup>2,3\*</sup>, Gregory De Crescenzo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3A7. <sup>2</sup>Life Sciences, NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal, QC, Canada, H4P 2R2 <sup>3</sup>Biochemical Department, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada, H3C 3J7 <sup>4</sup>Chemistry Department, University of Manitoba, 144 Dysart Road, Winnipeg, MB, Canada, R3T 2N2

\* Both authors equally contributed to this work. To whom correspondence should be addressed

### 4.2.1 Abstract

We here report the production and purification of the extracellular domains of two Fc $\gamma$  receptors, namely CD16a and CD64, by transient transfection in mammalian cells. The use of these two receptor ectodomains for the development of quantitative assays aiming at controlling the quality of monoclonal antibody production lots is then discussed. More specifically, the development of surface plasmon resonance-based biosensor assays for the evaluation of the glycosylation pattern and the aggregation state of monoclonal antibodies is presented. Our biosensor approach allows discriminating between antibodies harbouring different galactosylation profiles as well as to detect low levels (i.e., less than 2 %) of monoclonal antibody aggregates.

Keywords: CD16a, CD64, Monoclonal Antibody, Glycosylation, Surface Plasmon Resonance (SPR), Anti-Histidine capture, Aggregation

### 4.2.2 Introduction

Immunoglobulins are glycoproteins that are involved in the humoral response of the immune system, which enables the clearance of antigens (Saba et al. 2002). Among monoclonal antibodies (Mabs), immunoglobulins G (IgG) are the most widely used as therapeutic agents (Lim et al. 2008). IgGs are 150-kDa molecules composed of two heavy and light chains. When these Mabs target an antigen, an immune complex is formed; the latter may then be eliminated by the effectors functions of the immune system, such as the antibody- or the complement-dependent cellular cytotoxicity (ADCC or CDC) (Scallon et al. 2006). In order to fulfill this role at the molecular level, Mabs interact via their Fc region with various receptors present at the surface of leukocytes. Among these receptors are the Fc $\gamma$  receptors which are transmembrane proteins composed of either two or three extracellular units. Fc $\gamma$ Rs are subdivided in three distinct types, based on their structural features and their interactions with human IgGs: the type I receptor (Fc $\gamma$ RI or CD64) is unique, while different variants of the type II and type III receptors (Fc $\gamma$ RII or CD32 and Fc $\gamma$ RIII or CD16, respectively) have been identified (i.e., CD32a, CD32b, CD32c and CD16a, CD16b) (Powell and Hogarth 2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition and activation motifs (ITIM and ITAM, respectively), present in the intracellular portion of the Fc $\gamma$ Rs, are involved in signaling after receptor activation. Signaling through ITAM receptors (i.e., CD64,

CD32a and CD16a) results in cell activation, while engagement of ITIM receptors (i.e., CD32b) is inhibitory (Male et al. 2007). CD32 and CD16 are considered to be low-affinity receptors for IgGs with  $K_D$  of  $\sim 10^{-5}$ - $10^{-7}$  M (Lu et al. 2011; Radaev and Sun 2002). In contrast, CD64 displays a higher affinity for the Fc region of the Mabs ( $K_D$  of  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  M), more likely due to the presence of three binding domains in its extracellular moiety (Lu et al. 2011). While CD16a and CD64 are known to bind to IgGs with a 1:1 stoichiometry (Kato et al. 2000; Pollastrini et al. 2011; Radaev and Sun 2001), the stoichiometry of the CD32:IgG complex is still debated: results by Sonderman and colleagues have suggested a 2:1 stoichiometry using crystallography (Sondermann et al. 1999), whereas evidences from other reports might be indicative of a 1:1 interaction (Kato et al. 2000; Pollastrini et al. 2011).

The importance of antibody glycosylation upon interactions with Fc $\gamma$ Rs has been intensively studied over the last decade (Houde et al. 2010; Jefferis 2005; Okazaki et al. 2004; Shibata-Koyama et al. 2009; Spearman et al. 2011). The glycosylation of the IgGs on Asn297 confers a stable conformation to their Fc region, which enables the effector functions of the immune system. Furthermore, the absence of glycosylation on this specific residue is known to abrogate the antibody interactions with the Fc $\gamma$ Rs (Ghirlando et al. 1999; Krapp et al. 2003; Walker et al. 1989). Many studies have shown that the absence of core fucose in the Fc glycan of Mabs increases their affinity for CD16a, without however influencing Mab interactions with CD64 (Ferrara et al. 2011; Houde et al. 2010; Scallon et al. 2006; Shields et al. 2002). The same observation has been made in the presence of bisecting GlcNAc, as the latter likely reduces the amount of fucosylation (Umana et al. 1999). Highly sialylated Mabs were shown to harbour a reduced ADCC activity (Scallon et al. 2007), whereas Mabs bearing increased levels of galactosylation have been reported to bind to CD16a with higher affinity (Houde et al. 2010).

Altogether, these reports have highlighted the importance of IgG glycosylation upon binding to their receptors, subsequent ADCC and CDC, and ultimately their therapeutic effect. The latter may thus be improved by producing IgGs with specific glycan profiles. On that note, recent work has shown that a glycoform with no fucose has a 53-fold higher binding capacity to the receptor that triggers its therapeutic activity. This enhancement of ADCC allows this glycoform to be effective at lower doses (Shinkawa et al. 2003). The glycosylation profile of a recombinant Mab is dependent on a number of parameters that include the profile of the glycosylating enzymes in the producing cell line, the medium composition, the cell culture conditions as well as the method of downstream

processing. In a context where new therapeutic antibodies need to be on the market rapidly while the quality and integrity of the product need to be verified from batch to batch, it is essential to develop routine assays to evaluate Mab glycosylation profile as well as Mab aggregation state. In that endeavor, the design of robust assays combining surface plasmon resonance (SPR)-based biosensors with the use of FcγR ectodomains may be an interesting avenue as both Mab aggregation (Luo et al. 2009) and glycosylation (Ferrara et al. 2011) have been reported to affect Mab interactions with their receptor ectodomains when monitored by SPR biosensing. In this manuscript, we first report the production and purification of two FcγR ectodomains, i.e. those of CD16a and CD64, by transient transfection of mammalian cells in vitro. We then describe and discuss their potential use to develop an SPR assay aiming at assessing IgG glycosylation pattern and presence of aggregation.

## 4.2.3 Materials and Methods

### 4.2.3.1 Production of the extracellular domains of FcγRs

#### 4.2.3.1.1 Plasmids and DNA

Codon-optimized (human codon usage) cDNA encoding the CD16a (F158) variant (GENE ID: 2214 FCGR3A; amino acids 1-193) or CD64 (GENE ID: 2209 FCGR1A; amino acids 34-302 with signal peptide MWQLLLPTALLLVVSAGMRT) were cloned into pTT5 vector. Both constructs contain a H10G C-terminal tag preceded by a TEV cleavage site (ENLYFQGTGGSGHHHHHHHHHHG) to facilitate their purification. The pTTo-GFPq plasmid has been described elsewhere (Durocher et al. 2002). The pTT22-AKTDD plasmid is derived from pTT vector and encodes constitutively active bovine AKT (Alessi et al. 1996).

#### 4.2.3.1.2 CD16a[F-158]

The human embryonic kidney 293 cell line, stably expressing a truncated EBNA1 protein (HEK293-6E), was cultured in suspension in shake flasks (120 rpm) in 500 mL of FreeStyle™ F17 medium (Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 4 mM of glutamine, 25 mg/mL of geneticin and 0.1 % (v/v) of pluronic acid in a humidified incubator at 37°C with 5 % CO<sub>2</sub>. The cells were transfected at a density of  $1.6\text{--}2.0 \times 10^6$  cells/mL (Raymond et al, 2011). A total of 500 μg of plasmid (25 % pTT5-CD16aTevHis, 5 % pTTo-GFP and 70 % ssDNA) was diluted into 25



mL of F17 medium prior to the addition of 1.5 mg of linear 25-kDa polyethylenimine (L-PEI; Polysciences, Warrington, PA). The plasmids and L-PEI were mixed, vortexed and incubated for 3 min at room temperature (RT), before addition to the cells. One day post-transfection (dpt), TN1 peptone stock solution (20 % w/v) was added to the cell suspension in order to reach a final concentration of 0.5 % (w/v). The supernatant was harvested 5 dpt and clarified by centrifugation at 3 000 x g for 20 min.

#### *4.2.3.1.3 CD64*

The Chinese hamster ovary cell line expressing a truncated EBNA1 protein (CHO-3E7) (Raymond et al. 2012), was cultured in the same medium as for HEK293-6E cell line but without geneticin supplementation. Transfections were performed at a cell density of  $2 \times 10^6$  cells/mL. A total of 375 µg of plasmids containing 50 % pTT5-CD64a, 15 % pTT5-AKTDD (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 with T308D and S473D mutations), 5 % pTTo-GFP and 30 % ssDNA) was added to 25 mL of F17 while 2.62 mg of polyethylenimine max (PEI<sub>max</sub>; Polysciences, Warrington, PA) was diluted into 25 mL of F17. The two solutions were then mixed, vortexed and incubated for 15 min at RT, prior to be added to the cells. Cells were fed at 1 dpt with TN1 peptone 0.5 % (w/v), valproic acid (0.5 µM) and the temperature was shifted to 32°C to enhance protein production (Furukawa and Ohsuye 1998; Sunley et al. 2008). The supernatant was harvested at 12 dpt as described before.

#### *4.2.3.1.4 Purification*

Both receptors were purified by adapting the protocol described by Tom and colleagues (Tom et al. 2008). Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed as described in previous works by Boucher and colleagues (Boucher et al. 2008). Purified receptors were quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI).

### **4.2.3.2 IgG Production**

#### *4.2.3.2.1 Antibodies*

Trastuzumab (TZM), a humanized mouse IgG1, was selected as our reference antibody. The non-glycosylated TZM (TZM NG) corresponded to a TZM mutant where the Fc N-glycosylation site was abolished by substituting the Asparagine 297 by a Glutamine.

#### *4.2.3.2.2 Production*

TZM and TZM NG were produced by transient co-expression of the heavy and light chains in CHO-3E7 (Raymond et al. 2012). TZM was enriched in galactose (TZM-gal+) by the additional co-expression of the human beta 1,4-galactosyltransferase (Raymond et al, in preparation).

#### *4.2.3.2.3 Purification*

Cell cultures were centrifuged 20 min at  $3000 \times g$  at 6 dpt at a viability  $>80\%$  for TZM and TZM-gal, 7 dpt at a viability  $>65\%$  for TZM NG. The supernatants were collected and loaded onto a 4-mL MabSelect SuRe column (GE Healthcare, Mississauga, ON) equilibrated in PBS. The column was washed with PBS and IgGs were eluted with 100 mM citrate buffer at pH 3.6. The fractions containing the IgG were pooled and the citrate buffer was exchanged against PBS with an Econo-Pac® 10DG column (Bio-Rad, Mississauga, ON). Purified Mabs were sterile-filtered, aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . TZM-gal+ was concentrated on an Amicon Ultra-4 10K centrifugal filter unit (Millipore, Mississauga, ON) and incubated with neuraminidase (MP Biomedicals, Solon, OH) in 250 mM phosphate buffer at pH 5 overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  to remove sialic acid (TZM-gal) prior to purification on a 0.5-mL MabSelect SuRe column. The elution buffer was exchanged against water on an Amicon Ultra-4 30K centrifugal filter unit. Purified Mabs were quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop™ spectrophotometer.

### **4.2.3.3 Aggregate separation**

FcγRs and mAbs were purified by size-exclusion chromatography (SEC) using a Superdex200 column (GE Healthcare, Baie d'Urfe, Canada) to remove aggregates. The column was equilibrated with HBS-N (GE Healthcare) and 1 mL of sample was loaded onto the column at 1 mL/min. HBS-N buffer was used to elute the proteins. The aggregate-free Mabs as well as

aggregate fractions were individually pooled and quantified by absorbance at 280 nm using a spectrophotometer (Unico, Dayton, NJ).

#### **4.2.3.4 Glycosylation analysis**

##### *4.2.3.4.1 Trypsin digestion*

IgG Samples (ca. 0.1 mg) were dissolved in 25 mM ammonium bicarbonate (100  $\mu$ L) and digested with trypsin (5  $\mu$ g; Sigma, St. Louis, MO) at 37°C for 16 h. The digests were fractionated on an HPLC Waters system using a Vydac 218 TP54 Protein&Peptide C18 analytical column (300- $\text{\AA}$  pore size, 0.46x25cm, Separation Group, Hesperia, CA, USA). Solvent A was 5 % ACN in water with 0.1 % TFA and solvent B was 90 % ACN with 0.1 % TFA. An elution gradient was applied from 10 to 70 % ACN over 60 minutes. UV detection was performed at 245 nm. All fractions were collected manually, and then completely dried.

##### *4.2.3.4.2 N-Glycan isolation from intact glycoprotein*

Each sample solution (100  $\mu$ L; 50  $\mu$ g of glycoprotein) was treated with PNGaseF (2  $\mu$ L, 2U, Roche). After incubation at 37°C for 18 h digested mixtures were purified on a Carb-Clean<sup>TM</sup> cartridges (Phenomenex, Torrance, CA) according to the protocol supplied by manufacturer.

##### *4.2.3.4.3 Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometric (MALDI-MS) analysis*

Trypsin digested fractions were reconstituted in 7  $\mu$ L of deionized water and 1  $\mu$ L was spotted onto a partially dried matrix of 2,5-dihydroxybenzoic acid. Glycan fractions were spotted onto the matrix solution consisting of 2-aza-2-thiothymine/phenylhydrazine hydrochloride predeposited on the target and labeled with phenylhydrazine (PHN) (Lattova et al. 2010). MALDI-TOF/TOF-MS analysis was carried out in the reflectron positive or negative ion modes (UltrafleXtreme<sup>TM</sup>, Bruker, Billerica). Individual parent ions were manually selected for MS/MS experiments.

#### 4.2.3.5 SPR experiments

The SPR experiments were performed using Biacore 3000 and T100 instruments (GE Healthcare) at a flow rate of 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  at 25°C on CM5 sensor chips using HBS-EP 1X, pH 7.4 (GE Healthcare) as running buffer. Kinetic analysis (global fit) was performed with the BIAevaluation v.4.1.1 or Biacore T100 Evaluation softwares.

##### 4.2.3.5.1 CD16a surface

CD16a was covalently bound to the sensorchip by means of a standard amine coupling kit (GE Healthcare, 250 nM of CD16a injected for 1 min at 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  at pH 4.5) following the manufacturer's recommendations in order to reach a final response of 2000 RU. The reference surface was generated following the same protocol except for the injection of CD16a. TZM binding was monitored by injecting TZM solutions (diluted in HBS-EP buffer, GE Healthcare) on both surfaces for 2 min, followed by HBS-EP buffer injection (2 min) to monitor receptor/IgG dissociation. The concentrations of TZM were varied between 1 and 1000 nM. Data were double-referenced prior analysis (Myszka 1999).

##### 4.2.3.5.2 Anti-Histidine surface

As an alternative to covalent coupling, receptors were also stably captured at the surface of the biosensor by the means of an anti-Histidine antibody (His Capture Kit, GE Healthcare) that had been covalently bound to the surface as recommended by the manufacturer (approximately 13 000 RU). CD16a or CD64 were injected (0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively) over the anti-Histidine antibody surface for 1 min (125 RU and 78 RU, respectively). No receptor was injected over the reference surface. Mabs solutions were then injected over captured CD16a (1 – 1000 nM, 2 min), CD64 (0.1 – 300 nM, 1 min) and control surfaces. The receptor/IgG dissociation was monitored by injecting running buffer for 130 s or 740 s for CD16a or CD64, respectively. Surface regeneration (dissociation of free receptors and receptor/IgG complexes) was done by injecting glycine buffer (10 mM, pH 1.5, 1 min). Data were double-referenced prior analysis (Myszka 1999).

## 4.2.4 Results

### 4.2.4.1 Production of the extracellular domains of FcγRs

Plasmids corresponding to the extracellular portion of CD16a and CD64, each of them being tagged with ten histidine residues at its C-terminus, were used to produce the extracellular portions of these Fcγ receptors by transient transfection. CHO cells were selected for the production of CD64 as very low yields were obtained with our HEK293 cell line (data not shown). Both receptors were then purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Non-reducing PAGE gels were run with samples corresponding to each purification steps (Figure 4-1) : the lanes corresponding to CD16a and CD64 pools both featured a smear that more likely corresponded to receptor aggregation (Note that molecular weights were calculated to be around 25 kDa and 36 kDa for CD16a and CD64, without taking glycosylation into account). The protein at 40 kDa (Figure 1B, indicated by the arrow) more likely corresponded to a minute fraction of non-glycosylated CD64 as this receptor is known to be highly glycosylated (Lu et al. 2011). The yields were 34 mg and 3 mg of purified CD16a and CD64 per liter of medium, respectively.

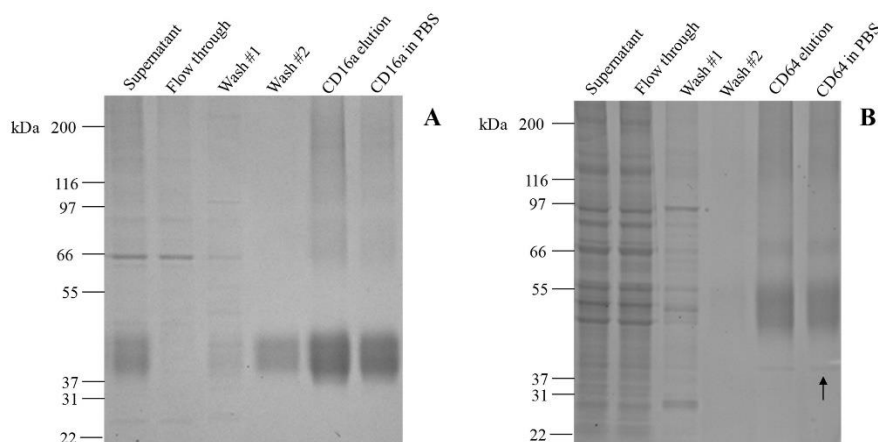


Figure 4-1 : Coomassie staining of non-reducing PAGE gels corresponding to the production of the extracellular portion of His-tagged CD16a (A) and CD64 (B). 75μL of sample corresponding to each purification step were loaded while 3μg (A) and 2.5μg (B) of both elution and PBS pool aliquots were loaded onto the non-reducing gel.

#### 4.2.4.2 Aggregate removal

Receptor extracellular portions and Mabs were then purified by SEC to remove soluble protein aggregates from the purified material (Figure 4-2) in order to ease subsequent SPR data interpretation. The integration of the chromatogram peak indicated that approximately 20 % of CD16a, 50 % of CD64 and 10 % of the Mabs were aggregated prior SEC purification. These values were consistent with results derived from analytical ultracentrifugation analysis of each sample prior SEC (data not shown).

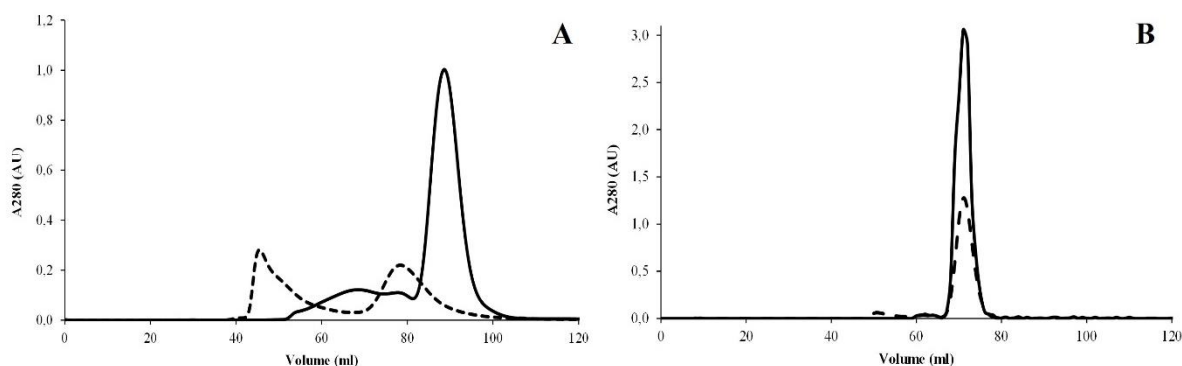


Figure 4-2 : Chromatograms corresponding to the SEC of Fc $\gamma$ R extracellular portions (A) and monoclonal antibodies (B) using a Sephadex 200 resin. The chromatograms correspond to the injection of 10 mg of CD16a (solid line, panel A), 3 mg of CD64 (dashed line, panel A), 10 mg of TZM (solid line, panel B) and 5 mg of TZM-gal (dashed line, panel B). Fractions from 84 to 94 mL were pooled for CD16a, while fractions from 74 to 84 mL were pooled for CD64 (A). Fractions from 69 to 73 mL and from 69 to 74 mL were pooled for TZM and TZM-gal, respectively (B).

#### 4.2.4.3 Kinetic experiments

Since our goal was to develop a high-throughput and versatile SPR assay based on the interaction between Fc $\gamma$  receptors binding to various antibodies, we chose to immobilize the extracellular portion of the receptors onto the SPR biosensor surface. Two approaches were tested. First, the receptor was covalently bound by amine coupling on the carboxymethyl dextran sensor

surface. The second approach relied on a sensor surface-bound anti-Histidine antibody to capture the His-tagged receptor extracellular portions in an oriented fashion.

Real-time monitoring of the interaction between CD16a and TZM was performed using a concentration range of 0 – 1000 nM of injected TZM, in duplicates (Figure 4-3). For both experiments, the baseline was stable before the injection of the analyte, and, at the end of the dissociation, the signal corresponding to the accumulated IgG went back to 0 response units (RU). Moreover, results from both assays were reproducible (replicate injections were almost superimposed). At the end of the injection phase, a downward slope was observed at high concentration of analyte with the anti-Histidine capture method (Figure 4-3B1). Such a decrease was not observed with the covalently bound CD16a surface (Figure 4-3A1). The sensorgrams were globally analyzed using a simple model (Langmuir interaction) (Figure 4-3 A2, B2) or a heterogeneous ligand model (Figure 4-3 A3, B3). The latter was chosen to better describe complex kinetics more likely emanating from the presence of distinct receptor populations at the sensor surface due to non-oriented coupling procedure of our first experimental strategy. The related kinetic parameters are given in Table 4-1. For each assay, the apparent thermodynamic dissociation constants were also calculated from the plateau values observed at the end of each injection, assuming a Langmuirian interaction (Table 4-1).

To study the interaction between CD64 and TZM, SPR assays were carried out using the anti-Histidine capture method (Figure 4-4, Table 4-2). TZM was injected at concentrations ranging from 0 to 300 nM. The baseline was stable before the injection of the analyte and the experiments reproducible, as one can judge from the sensorgrams resulting from duplicate injections. However, at 100 and 300 nM, the response signal went below the baseline during the dissociation phase. The set of sensorgrams was globally fit using a simple kinetic model in order to get a gross approximation of the kinetic parameters of the interaction (Figure 4-4, Table 4-2). The amine-coupling strategy was also tried with CD64, but, as we were unable to regenerate the surface in between Mab injections, the approach was thus abandoned (data not shown).

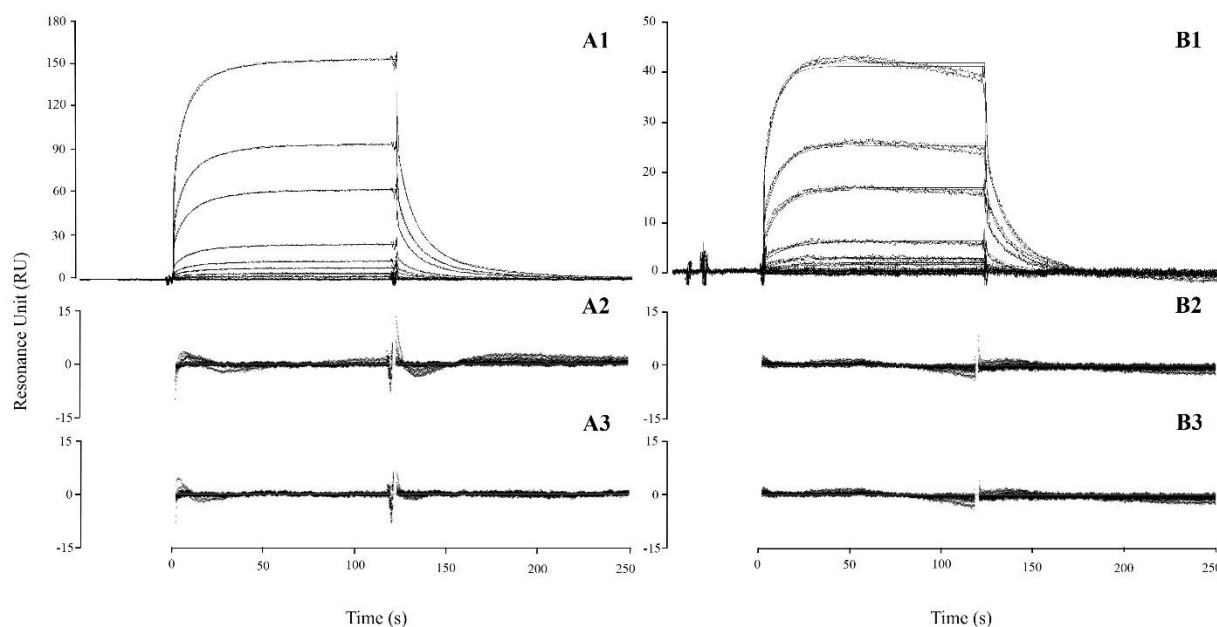


Figure 4-3 : Sensorgrams corresponding to the interactions between injected TZM (0; 1; 5; 10; 15; 30; 50; 100; 300; 500; 1000 nM, duplicate injections) and CD16a that had been covalently immobilized by amine coupling (A) or captured via its His-tag by a covalently bound anti-Histidine antibody (B). Double-referenced sensorgrams were globally fit using a 1:1 simple model (A2, B2 for corresponding residual plots) and heterogeneous ligand model (A3, B3 for corresponding residual plots). Global fits corresponding to the heterogeneous ligand model (A1) and the 1:1 simple model (B1) are shown as solid lines.



Table 4-1 : Kinetics parameters related to the interactions of CD16a with TZM

	Covalent immobilization of CD16a		CD16a captured by anti-Histidine	
	Langmuir	Heterogeneous ligand	Langmuir	Heterogeneous ligand
$k_{a1}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$(4.38 \pm 0.02) \times 10^4$	$(6.12 \pm 0.02) \times 10^4$	$(6.98 \pm 0.11) \times 10^4$	$(6.55 \pm 0.10) \times 10^4$
$k_{d1}$ ( $s^{-1}$ )	$0.05 \pm 5.49 \times 10^{-5}$	$0.09 \pm 2.38 \times 10^{-4}$	$0.08 \pm 5.12 \times 10^{-4}$	$0.08 \pm 5.21 \times 10^{-4}$
$K_{D1}$ (M)	$1.25 \times 10^{-6}$	$1.42 \times 10^{-6}$	$1.16 \times 10^{-6}$	$1.23 \times 10^{-6}$
$k_{a2}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	-	$(1.60 \pm 0.02) \times 10^4$	-	$62.80 \pm 1.86 \times 10^3$
$k_{d2}$ ( $s^{-1}$ )	-	$0.02 \pm 9.28 \times 10^{-5}$	-	$0.119 \pm 0.545$
$K_{D2}$ (M)	-	$1.04 \times 10^{-6}$	-	$1.89 \times 10^{-3}$
$R_{\max 1}$ (RU)	$179.0 \pm 0.5$	$183.0 \pm 0.5$	$55.2 \pm 0.604$	$54.6 \pm 0.6$
$R_{\max 2}$ (RU)	-	$32.1 \pm 0.3$	-	$0.09 \pm 2.82$
$R_{\max 1}$ (%)	-	85.1	-	99.8
$R_{\max 2}$ (%)	-	14.9	-	0.2
$\chi^2$	0.507	0.215	0.707	0.697
$K_{Dequilibrium}$ (M)	$1.59 \times 10^{-6}$		$1.97 \times 10^{-6}$	

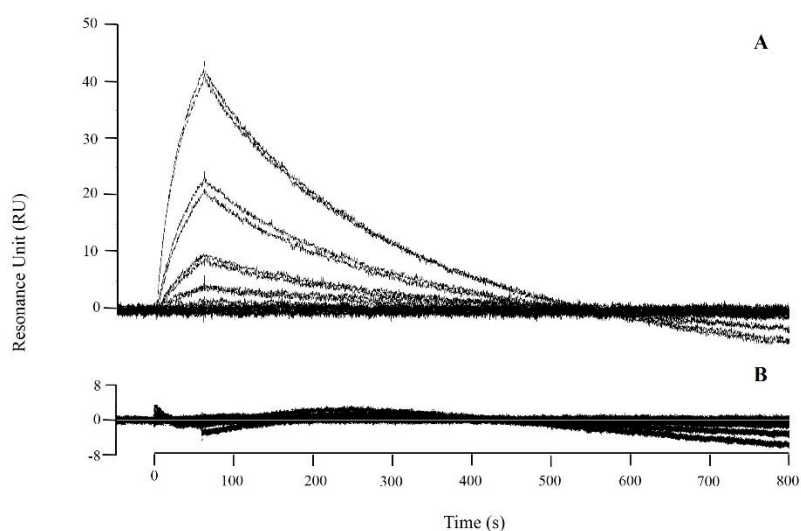


Figure 4-4 : Sensorgrams corresponding to the interactions between injected TZM (0; 0.1; 0.3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 nM), and CD164 that had been captured via its His-tag by a covalently bound anti-Histidine antibody (A). The kinetics were fitted using the Langmuir model (B).

Table 4-2 : Kinetics parameters for anti-His captured CD64 interacting with TZM

Simple model	
$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$(1.162 \pm 0.002) \times 10^5$
$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$(6.100 \pm 0.006) \times 10^{-3}$
$K_D$ (M)	$5.2 \times 10^{-8}$
$R_{max}$ (RU)	$56.3 \pm 0.1$
$\chi^2$	1.46

#### 4.2.4.4 Effect of TZM aggregation on kinetics

The impact of two types of Mab aggregates upon binding kinetics to CD16a was then assayed with the anti-His capture assay. The aggregates were collected during the SEC final purification step for TZM and pooled into two distinct fractions: high (i.e., corresponding to the peak being closest to that of the monomeric Mab) and very high molecular weight (corresponding

to higher molecular weight fractions), now noted HMW and VHMW, respectively. Monomeric TZM was injected at a fixed concentration (1000 nM) to which increasing amounts of aggregates had been added, i.e., from 0 to 50 % (w/w) (Figure 4-5). In order to evaluate the binding contribution of monomers vs aggregates, the corrected SPR signals at 170 s in Figure 4-5 A and B were used since it had been observed that TZM injected over CD16a was completely dissociated at 170 s (Figure 4-3B1 and Figure 4-5A and B). Histograms showing accumulated TZM aggregates at 170 s (RU) for the different percentages of HMW and VHMW, are shown in Figure 4-5C. A close-up view of the 0 – 1.85 % (w/w) range is also provided on Figure 4-5D. Since the noise of the SPR biosensor has been determined to be around 1 RU, a threshold of 3 RUs was used to evaluate the limit of detection for the aggregates. The presence of 1.85 % of HMW or, alternatively, 0.62 % of VHMW TZM could be detected with our captured CD16a surface. Note that the 170-s time point was chosen in this manuscript since we repeatedly observed total dissociation of monomeric TZM at that time point for more than 10 independent experiments; this time point could however be shifted towards higher values (e.g., 200 s) to increase the robustness of the assay (i.e., make sure that all monomeric TZM has been eluted) since the apparent dissociation rates of monomeric and aggregated antibodies are extremely dissimilar.

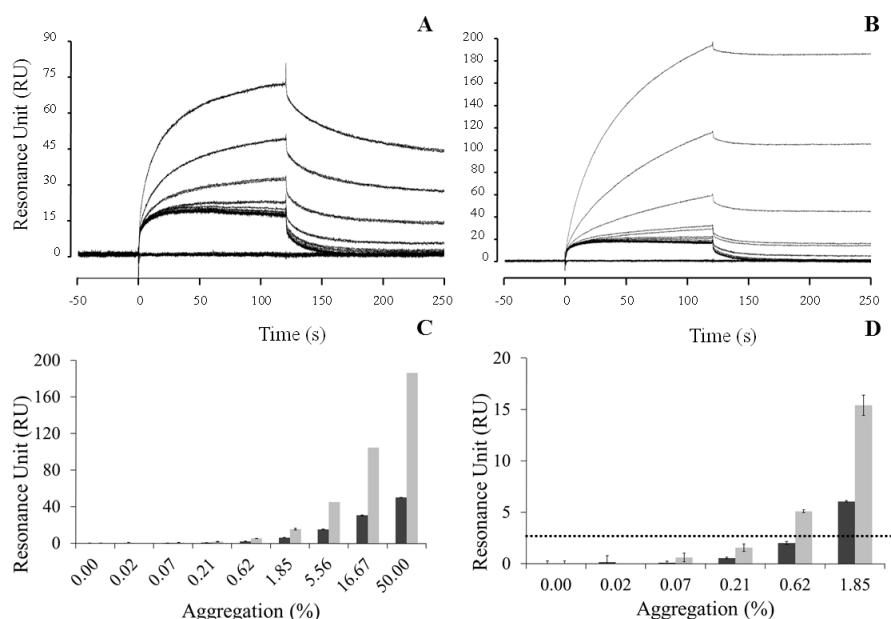


Figure 4-5 : Effect of TZM aggregation on its kinetics of dissociation from CD16a. Sensorgrams corresponding to the injection of 1000 nM monomeric TZM in the presence of 0 – 50 % of HMW and VHMW aggregates over captured CD16a are shown in Panels (A) and (B), respectively (The two bottom curves on each panel correspond to aggregate-free TZM injections). Remaining amount of TZM at 170 s, time at which aggregate-free TZM was observed to be completely eluted, is shown in Panel C. For low percentage of aggregated TZM, a close-up of Panel C is given (D). Any response above the dash line at 3 RU is considered to be different from the non-aggregated pool of TZM (D).

#### 4.2.4.5 Glycosylation analysis of IgGs

Mass spectrometric analysis of the glycan pools obtained from individual TZM samples confirmed the differences in N-glycan profiles. The dominant oligosaccharide peak derived from the TZM model was observed at  $m/z$  1575.61 and its fragmentation pattern corresponded to the biantennary core-fucosylated structure with zero galactose (Figure 4-6A). A glycan displaying galactose on both antennae ( $m/z$  1899.73) was observed with the highest intensity in the engineered TZM-gal sample (Figure 4-6B). The same differences in the abundances of galactosylated and non-galactosylated glycans were observed in the spectra recorded from the glycopeptides resulting from

trypsin digested samples. Most of these glycopeptides were consistent with the peptide sequence EEQYNSTYR (m/z 1189.51) with glycosylation site at the Asp297. As expected, no glycan or glycopeptide were detected in the positive or negative ion modes when TZM NG sample was treated and analyzed under the same conditions (i.e., non-glycosylated; data not shown).

The SPR assay relying on the capture of CD16a by means of an anti-His antibody at the surface of our biosensor (Figure 4-3B) was then evaluated for its ability to evaluate the impact of TZM glycosylation upon CD16a binding with a single Mab injection. 1000 nM of TZM, TZM-gal and TZM NG were injected in duplicates (Figure 4-7). As expected, no interaction was observed between CD16a and TZM NG. For TZM and TZM-gal, the responses at the end of the injection phase was normalized to 100 RU in order to compare their dissociation profiles. Complete dissociation from CD16a was observed at 170 and 240 s for TZM and TZM-gal, respectively (Figure 4-7).

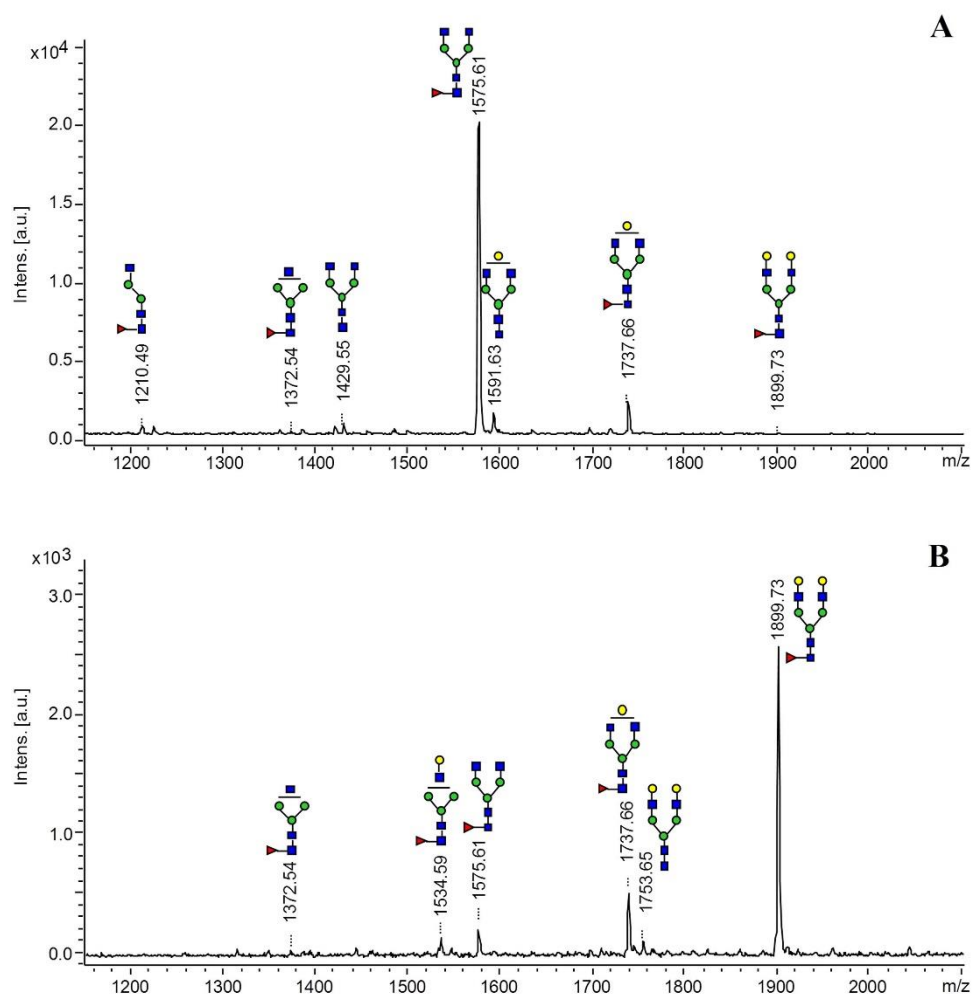


Figure 4-6 : MALDI-TOF/TOF mass spectra recorded in the reflectron positive ion mode for N-glycan pools obtained from MAbs: TzM (A) and TzM-gal (B). Glycans are labeled with PHN (+90.05) and detected as  $MNa^+$ . Proposed structures are deduced from MS/MS fragmentation patterns and from the data obtained before and after exoglycosidase digestion with the  $\beta$ -galactosidase. Symbols: red triangle (fucose), blue square (N-acetyl-glucosamine), green circle (mannose) and yellow circle (galactose).

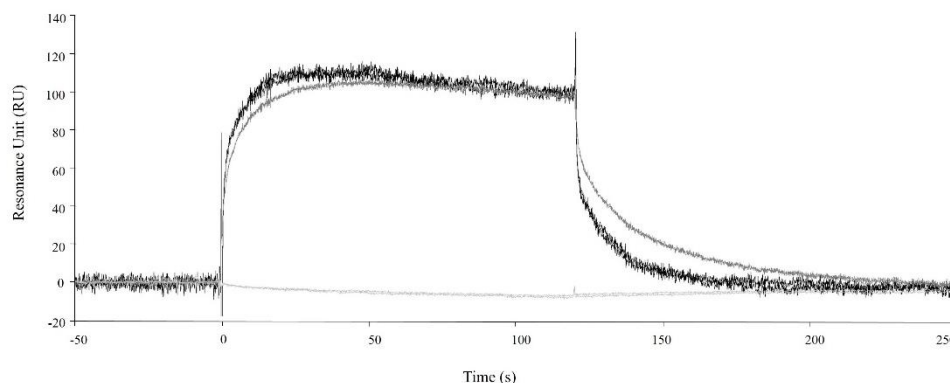


Figure 4-7 : Sensorgrams corresponding to the injection of TZM (black), TZM NG (light gray), TZM-gal (dark gray) at 1000 nM over CD16a using the anti-Histidine capture method, in duplicates.

## 4.2.5 Discussion

### 4.2.5.1 SPR Assay Development

SPR has been used in many studies in order to evaluate the kinetic constants of IgG/Fc $\gamma$ R complexes. Among these studies, either receptors or antibodies have been immobilized, in an oriented manner or not, on the biosensor surface. Additionally, the variety of setups - especially in terms of orientation of the partners, flow rates and ligand densities - yielded discrepancies between the values reported in the literature. We here produced CD16a and CD64 using mammalian expression systems in order to get appropriate glycosylation pattern for these receptor extracellular soluble moieties, while receptor aggregates were removed by SEC before developing our biosensor assay (Figure 4-1 and Figure 4-2). Great care was also taken of to optimize SPR experiments: high flow rate (50  $\mu$ L/min) and low receptor densities were used to avoid any mass transport/rebinding artefact that might have hampered subsequent data analysis (Myszka 1999). At last, the impact of receptor orientation at the biosensor surface was also addressed by comparing covalent (random) coupling to His-tag mediated stable capture (Figure 4-3, Table 4-1). For CD16a, our experimental results unambiguously demonstrated that the type of immobilization (random versus oriented) of this ectodomain greatly influenced its binding to TZM. Indeed, random covalent coupling lead to complex kinetics, more likely resulting from the presence of multiple receptor populations at the

biosensor surface (those were induced by the amine coupling procedure) whereas data corresponding to TZM binding to captured His-tagged CD16a were fit with a 1:1 interaction model with equivalent residual profiles as those corresponding to more complex kinetic model (Figure 4-3). Altogether, the apparent dissociation constant related to TZM interactions with CD16a, as determined with both approaches (random coupling / His tag capture), either derived from the plateau values or the ratio of the kinetics rates determined by global fit, is approximately 1  $\mu\text{M}$  (Table I). Both apparent kinetic and thermodynamic constants we derived are in excellent agreement with those reported in the literature by others research groups (Lu et al. 2011; Radaev and Sun 2002), thus validating our protein expression system as well as our purification protocols. Additionally, our findings for oriented versus random capture, are also consistent with the literature: the non-oriented immobilization of CD16a has already been observed to give higher  $K_D$  values compared to an oriented approach ( $\sim 1.6 \mu\text{M}$  and  $\sim 0.4 \mu\text{M}$ , respectively) (Bruhns et al. 2009; Galon et al. 1997; Li et al. 2007; Luo et al. 2009). The same trend has also been reported when IgGs were immobilized and CD16a injected (Ha et al. 2011; Lu et al. 2011; Maenaka et al. 2001).

In spite of all our efforts to eliminate experimental artefacts that may bias SPR data, the depiction of captured CD16a data by a simple interaction model was good but not perfect. Using the anti-His capture method, a downward slope was indeed noticeable at the end of the TZM injection phase (Figure 4-3B1). Of interest, this type of profile has already been observed by others (Luo et al. 2009; Zeck et al. 2011). This hump within the injection phase may have several origins. First, it may be due to the occurrence of weak interactions between TZM and the anti-His antibody/biosensor matrix: CD16a capture would then block partially these TZM interactions on the test surface but not to the same extent on the control surface. Second, if several populations of TZM interact with CD16a with distinct kinetics and if those populations are different in terms of mass, e.g. due to different glycosylation profiles, such a hump may be observed if the higher-mass population dissociates faster from CD16a than the lower-molecular weight species. The sensorgram corresponding to the injection of non-glycosylated TZM on CD16a (a negative control as non-glycosylated antibodies do not interact with CD16a (Walker et al. 1989), Figure 4-7) highly surface. The second approach relied on a sensor surface-bound anti-Histidine antibody to capture the His-tagged receptor extracellular portions in an oriented fashion.



Real-time monitoring of the interaction between CD16a and TzM was performed using a concentration range of 0 – 1000 nM of injected TzM, in duplicates (Figure 4 3). For both experiments, the baseline was stable before the injection of the analyte, and, at the end of the dissociation, the signal corresponding to the accumulated IgG went back to 0 response units (RU). Moreover, results from both assays were reproducible (replicate injections were almost superimposed). At the end of the injection phase, a downward slope was observed at high concentration of analyte with the anti-Histidine capture method (Figure 4 3B1). Such a decrease was not observed with the covalently bound CD16a surface (Figure 4 3A1). The sensorgrams were globally analyzed using a simple model (Langmuir interaction) (Figure 4 3 A2, B2) or a heterogeneous ligand model (Figure 4 3 A3, B3). The latter was chosen to better describe complex kinetics more likely emanating from the presence of distinct receptor populations at the sensor surface due to non-oriented coupling procedure of our first experimental strategy. The related kinetic parameters are given in

#### Impact of aggregation and glycosylation upon TzM/CD16a kinetics

The influence of the aggregation of IgGs upon their kinetics of interaction with the FcγRs receptor within a SPR assay has already been discussed through the literature (Li et al. 2007; Luo et al. 2009). However, to our knowledge, there are currently no studies dealing with the limit of detection of aggregation by SPR and whether both partners (i.e. receptor and antibody) need to be aggregate-free when carrying out an experiment to get accurate kinetics. In our hands the presence of aggregates in the CD16a pool did not influence the kinetics as similar sensorgrams to those related to monomeric CD16a were obtained with IMAC purified CD16a that had not been SEC purified (Figure A 1). In stark contrast, the presence of aggregates within the TzM pool greatly influenced the kinetics of binding to CD16a (Figure 4-5), thus confirming that size exclusion chromatography is necessary for the Mab samples, prior performing an accurate kinetic characterization. Since as few as 1.85 % of analyte aggregate was detectable, the use of SPR biosensors combined to captured CD16a may thus be a good alternative to analytical ultracentrifugation in order to evaluate rapidly the presence of aggregates within a given sample. The limit of detection of such a SPR assay could be significantly improved by increasing the amount of captured receptor on the sensor chip (thus increasing the signal-to-noise ratio).

The anti-His capture strategy that we developed for CD16a was then proven to be efficient to discriminate between various patterns of glycosylation of the same antibody (Figure 4-6) based on antibody dissociation from CD16a (Figure 4-7). More precisely, non-glycosylated TZM did not bind to CD16a, in excellent agreement with the literature (Ghirlando et al. 1999; Krapp et al. 2003; Walker et al. 1989), while a hyper-galactosylated (mostly G2F) version of TZM (Figure 4-6) formed a more stable complex with CD16a when compared to our model TZM (Figure 4-7). This observation is consistent with previous results from Houde and colleagues when using a competitive binding assay (Houde et al. 2010).

#### **4.2.6 Conclusion**

The extracellular portion of both CD16a and CD64 were produced by transient transfection in mammalian cells in order to develop a surface-based assay based on the real-time monitoring interactions with Mabs. Altogether, our results demonstrate that the oriented capture of CD16a at the biosensor surface is promising for the set up of an assay aiming at a) detecting the presence of aggregates within the injected solution of antibody while b) assessing the glycosylation profile of the antibody. Since the evaluation of both the aggregation state and the glycosylation profile of a given antibody sample only requires a single injection, an SPR assay based on captured CD16a may thus be implemented as a high-throughput routine assay in a Mab screening platform.

#### **4.2.7 Acknowledgements**

The authors would like to thank Louis Bisson and Sylvie Perret for their help with cell culture and Denis L'Abbé (NRC) for kindly providing aggregated TZM samples. This work was supported by the NSERC Strategic Network for The Production of Single-type Glycoform Monoclonal Antibodies (MabNet) group.

### 4.2.8 References

- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15(23):6541-51.
- Boucher C, St-Laurent G, Loignon M, Jolicoeur M, De Crescenzo G, Durocher Y. 2008. The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue Eng Part A* 14(12):2069-77.
- Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113(16):3716-25.
- Durocher Y, Perret S, Kamen A. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *NAR* 30(2):E9.
- Ferrara C, Grau S, Jager C, Sondermann P, Brunner P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M and others. 2011. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *PNAS* 108(31):12669-74.
- Furukawa K, Ohsuye K. 1998. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal alpha-amidating enzyme. *Cytotechnology* 26(2):153-64.
- Galon J, Robertson MW, Galinha A, Mazieres N, Spagnoli R, Fridman WH, Sautes C. 1997. Affinity of the interaction between Fc gamma receptor type III (Fc gammaRIII) and monomeric human IgG subclasses. Role of Fc gammaRIII glycosylation. *Eur J Immunol* 27(8):1928-32.
- Ghirlando R, Lund J, Goodall M, Jefferis R. 1999. Glycosylation of human IgG-Fc: influences on structure revealed by differential scanning micro-calorimetry. *Immunol Lett* 68(1):47-52.
- Ha S, Ou Y, Vlasak J, Li Y, Wang S, Vo K, Du Y, Mach A, Fang Y, Zhang N. 2011. Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology* 21(8):1087-96.
- Houde D, Peng Y, Berkowitz SA, Engen JR. 2010. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics* 9(8):1716-28.
- Jefferis R. 2005. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* 21(1):11-6.

Kato K, Sautès-Fridman C, Yamada W, Kobayashi K, Uchiyama S, Kim H, Enokizono J, Galinha A, Kobayashi Y, Fridman WH and others. 2000. Structural basis of the interaction between IgG and fc[gamma] receptors. *J Mol Biol* 295(2):213-224.

Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sondermann P. 2003. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 325(5):979-89.

Li P, Jiang N, Nagarajan S, Wohlhueter R, Selvaraj P, Zhu C. 2007. Affinity and kinetic analysis of Fcgamma receptor IIIa (CD16a) binding to IgG ligands. *J Biol Chem* 282(9):6210-21.

Lim A, Reed-Bogan A, Harmon BJ. 2008. Glycosylation profiling of a therapeutic recombinant monoclonal antibody with two N-linked glycosylation sites using liquid chromatography coupled to a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Anal Biochem* 375(2):163-72.

Lu J, Ellsworth JL, Hamacher N, Oak SW, Sun PD. 2011. Crystal structure of Fcgamma receptor I and its implication in high affinity gamma-immunoglobulin binding. *J Biol Chem* 286(47):40608-13.

Luo Y, Lu Z, Raso SW, Entrican C, Tangarone B. 2009. Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fcgamma receptors. *Mabs* 1(5):491-504.

Maenaka K, van der Merwe PA, Stuart DI, Jones EY, Sondermann P. 2001. The human low affinity Fc gamma receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem* 276(48):44898-44904.

Male DK, Roitt Y, Brostoff J. 2007. *Immunologie*: Elsevier Masson.

Myszka DG. 1999. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12(5):279-84.

Okazaki A, Shoji-Hosaka E, Nakamura K, Wakitani M, Uchida K, Kakita S, Tsumoto K, Kumagai I, Shitara K. 2004. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and Fc gamma RIIIa. *J Mol Biol* 336(5):1239-1249.

Pollastrini J, Dillon TM, Bondarenko P, Chou RYT. 2011. Field flow fractionation for assessing neonatal Fc receptor and Fc gamma receptor binding to monoclonal antibodies in solution. *Anal Biochem* 414(1):88-98.

Powell MS, Hogarth PM. 2008. Fc Receptors. Multichain Immune Recognition Receptor Signaling: From Spatiotemporal Organization to Human Disease. Berlin: Springer-Verlag Berlin. p 24-34.

Radaev S, Sun P. 2002. Recognition of immunoglobulins by Fc[gamma] receptors. *Mol Immunol* 38(14):1073-1083.

Radaev S, Sun PD. 2001. Recognition of IgG by Fc gamma receptor - The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem* 276(19):16478-16483.

Raymond C, Robotham A, Kelly J, Lattová E, Perreault Hln, Durocher Y. 2012. Production of Highly Sialylated Monoclonal Antibodies. In: (Ed.) DSP, editor. Glycosylation: InTech.

Saba JA, Kunkel JP, Jan DC, Ens WE, Standing KG, Butler M, Jamieson JC, Perreault H. 2002. A study of immunoglobulin G glycosylation in monoclonal and polyclonal species by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 305(1):16-31.

Scallon BJ, Snyder LA, Anderson GM, Chen Q, Yan L, Weiner LM, Nakada MT. 2006. A review of antibody therapeutics and antibody-related technologies for oncology. *J Immunother* 29(4):351-64.

Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cal AN, Raju TS. 2007. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol* 44(7):1524-1534.

Shibata-Koyama M, Iida S, Misaka H, Mori K, Yano K, Shitara K, Satoh M. 2009. Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for Fc gamma RIIB and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Exp Hematol* 37(3):309-321.

Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. 2002. Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human FcγRIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. *J Biol Chem* 277(30):26733-26740.

Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M and others. 2003. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278(5):3466-73.

- Sondermann P, Huber R, Jacob U. 1999. Crystal structure of the soluble form of the human fcgamma-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J* 18(5):1095-103.
- Spearman M, Dionne B, Butler B. 2011. Chapter 12: The Role of Glycosylation in Therapeutic Antibodies. *Antibody Expression and Production*: Springer.
- Sunley K, Tharmalingam T, Butler M. 2008. CHO cells adapted to hypothermic growth produce high yields of recombinant beta-interferon. *Biotechnol Prog* 24(4):898-906.
- Tom R, Bisson L, Durocher Y. 2008. Purification of His-Tagged Proteins Using Fractogel-Cobalt. *Cold Spring Harbor Protocols* 2008(3):pdb.prot4980.
- Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. 1999. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* 17(2):176-80.
- Walker MR, Lund J, Thompson KM, Jefferis R. 1989. Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors. *J Biochem* 259(2):347-53.
- Zeck A, Pohlentz G, Schlothauer T, Peter-Katalinic J, Regula JT. 2011. Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcgammaRIIIa. *J Proteome Res* 10(7):3031-9.

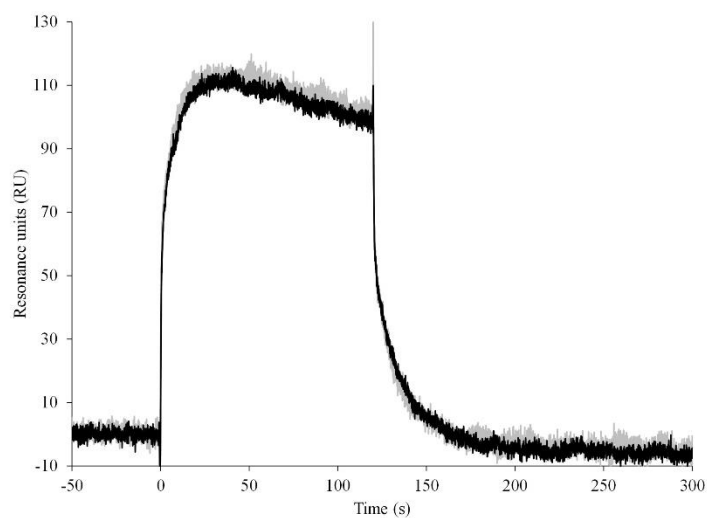


Figure A 1 : Sensorgrams corresponding to the duplicate injections of TZM (1000 nM) over anti-Histidine captured CD16a prior (gray) and after (black) aggregate removal by SEC.

## Chapitre 5 ARTICLE 2 : BIOTINYLATION DU DOMAINE EXTRACELLULAIRE DES RÉCEPTEURS Fc $\gamma$ PAR CO- TRANSFECTION DES CELLULES DE MAMMIFÈRE : APPLICATION POUR LE DÉVELOPPEMENT D'UN ESSAI BASÉ SUR LA DÉTECTION DE LA RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE

### 5.1 Présentation de l'article

Cette section reprend l'article intitulé « **Biotinylation of the Fc $\gamma$  receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay** ». Il a été publié dans la revue Journal of Molecular Recognition en 2016 (Volume 29, pages 60-69).

Ce manuscrit présente la production du domaine extracellulaire biotinylé de quatre récepteurs Fc $\gamma$  et leur capture par la streptavidine à la surface du biocapteur. Pour la biotinylation des récepteurs, on présente une approche *in-cell* basé sur le principe de co-transfection de deux plasmides correspondant à l'ectodomaine du récepteur Fc $\gamma$  et l'enzyme BirA dans les cellules de mammifère. Cette stratégie est comparée à une méthode standard de biotinylation *in vitro* en tenant compte du niveau de biotinylation et le rendement de production. Les récepteurs biotinylés ont été produits par les deux stratégies puis analysés par ultracentrifugation analytique et par résonance des plasmons de surface. Nous démontrons que la biotinylation *in-cell* est une alternative intéressante à un protocole standard de biotinylation puisqu'il requiert moins d'étape de purification et nous permet d'obtenir un meilleur rendement. Finalement, les récepteurs biotinylés sont utilisés afin de développer un essai SPR fonctionnel permettant d'évaluer l'impact du patron de glycosylation des anticorps monoclonaux sur les interactions avec CD16a et CD64. Les résultats obtenus nous montrent que trastuzumab (TzM) hautement galactosylé (TzM-gal) et non glycosylé (TzM-NG) présentent des cinétiques différentes par rapport au trastuzumab modèle. Plus précisément, aucune interaction n'est détectée entre TzM-NG et CD16a et TzM-gal forme un complexe plus stable avec CD16a comparativement au TzM de référence. Par contre, les deux TzM glycosylés interagissent avec CD64 de façon similaire, mais TzM-NG se dissocie plus rapidement avec le récepteur haute affinité.



## **5.2 Biotinylation of the Fc $\gamma$ receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay**

July Dorion-Thibaudeau<sup>1,2</sup>, Gilles St-Laurent<sup>2</sup>, Céline Raymond<sup>2,3</sup>, Gregory De Crescenzo<sup>1\*</sup>, Yves Durocher<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3A7. <sup>2</sup>Life Sciences, NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal, QC, Canada, H4P 2R2 <sup>3</sup>Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, H3C 3 J7

### 5.2.1 Abstract

We here report the production of four biotinylated Fc $\gamma$ R receptor (Fc $\gamma$ R) ectodomains and their subsequent stable capture on streptavidin-biosensor surfaces. For receptor biotinylation, we first describe an in-cell protocol based on the co-transfection of two plasmids corresponding to one of the Fc $\gamma$ R ectodomains and the BirA enzyme in mammalian cells. This strategy is compared to a standard sequential in vitro enzymatic biotinylation with respect to biotinylation level and yield. Biotinylated Fc $\gamma$ R ectodomains that have been prepared with both strategies are then compared by analytical ultracentrifugation and surface plasmon resonance (SPR) analyses. Overall, we demonstrate that in-cell biotinylation is an interesting alternative to standard biotinylation protocol, as it requires less purification steps while yielding higher titers.

Finally, biotin-tagged Fc $\gamma$ Rs produced with the in-cell approach are successfully applied to the development of SPR-based assays to evaluate the impact of the glycosylation pattern of monoclonal antibodies on their interaction with CD16a and CD64. In that endeavour, we unambiguously observe that highly-galactosylated, non-glycosylated and reference Trastuzumab are characterized by different kinetic profiles upon binding to CD16a and CD64 that had been captured at the biosensor surface via their biotin tag. More precisely, while non-glycosylated TZM binding to CD16a was not detected, highly-galactosylated TZM formed a more stable complex with CD16a than our reference TZM. In contrast, both glycosylated TZM bound to captured CD64 in a stable and similar fashion, whereas the interaction of their non-glycosylated form with CD64 was characterized by a higher dissociation rate.

Keywords: Fc $\gamma$ R, BirA enzyme, Biotin Acceptor Peptide (BAP), Monoclonal Antibody, Glycosylation, Surface Plasmon Resonance

### 5.2.2 Introduction

Fcγ receptors (FcγRs) are transmembrane proteins divided in three types, based on their interactions with IgG and structural attributes. While different variants of the type III (FcγRIIIa/b or CD16a/b) and type II (FcγRIIa-c or CD32a-c) receptors have been found, the type I receptor (FcγRI or CD64) is unique (Powell and Hogarth 2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition and activation motifs (ITIM and ITAM, respectively), present in the intracellular domain of the FcγRs, are involved in signaling after receptor activation. Signaling through ITAM receptors (i.e., CD16a, CD32a and CD64) results in cell activation, while that from ITIM receptors (i.e., CD32b) is inhibitory (Male et al. 2007). CD32 and CD16 are considered to be low-affinity receptors with  $K_{DS}$  for the Fc region of monoclonal antibodies (Mabs) of  $\sim 10^{-5}$ - $10^{-7}$  M (Lu et al. 2011; Radaev and Sun 2002). In contrast, CD64 presents a higher affinity for Mabs ( $K_D$  of  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  M), more likely due to the presence of a third binding domain in its extracellular portion (Lu et al. 2011). CD16a and CD64 are known to bind to IgGs with a 1:1 stoichiometry (Kato et al. 2000; Pollastrini et al. 2011; Radaev and Sun 2001) but for CD32, the stoichiometry remains unclear. That is, crystallographic results by Sonderrmann and colleagues have pointed towards a 2:1 stoichiometry (Sonderrmann et al. 1999), whereas other experiments (analytical ultracentrifugation and asymmetrical flow field flow fractionation) tend to be indicative of a 1:1 interaction (Kato et al. 2000; Pollastrini et al. 2011).

Mabs have been used as therapeutic agents for many years now. The most widely used Mabs belong to the immunoglobulin G (IgG) family, being characterized by a ~150-kDa molecular weight and composed of two cysteine-bound heavy and light chains. When an IgG targets a cell-surface antigen, its Fc domain engages immune cells through interactions with FcγRs expressed at their surface. This, in turn, activates the effector functions of the immune system, such as the antibody- or the complement-dependent cellular cytotoxicity (ADCC or CDC). The interactions between FcγRs and IgGs are thus often of critical importance to achieve a therapeutic effect and they can be positively or negatively modulated. Of salient interest, many studies have reported how glycosylation of the Fc domain of IgG influences the interactions with these receptors (Houde et al. 2010; Jefferis 2005; Okazaki et al. 2004; Shibata-Koyama et al. 2009). For example, the absence of glycosylation on the Asn297 residue of the heavy chain is known to abrogate IgG interactions with CD16a and CD64 (Krapp et al. 2003; Leader et al. 1991; Walker et al. 1989) while the lack of a core fucose in the Fc glycan increases IgG affinity for CD16a (Ferrara et al. 2011; Houde et

al. 2010; Scallon et al. 2006; Shields et al. 2002). The same observation has been made with bisecting GlcNAc, most likely as it reduces the level of fucosylation (Umana et al. 1999). On the same note, high levels of sialylation were shown to reduce ADCC activity (Scallon et al. 2007), whereas Mabs presenting increased levels of galactosylation have been shown to interact with CD16a with higher affinity (Dorion-Thibaudeau et al. 2014; Houde et al. 2010).

The therapeutic effect of a given antibody may thus be improved by enriching recombinant IgG bearing specific glycan structures. This can be achieved by manipulating several bioprocess parameters such as the production cell line, the medium composition, the cell culture conditions and the downstream processing, or alternatively, by in-cell or in vitro glycan remodeling (Durocher and Butler 2009; Raymond et al. 2012; Spearman et al. 2011). Since the glycosylation profile of a given Mab may vary from batch to batch, it is important to assess it. As the glycosylation profile of therapeutic Mabs influences their interactions with Fc $\gamma$  receptors, surface plasmon resonance (SPR) assays based on the use of the ectodomain of these receptors may be of most interest to evaluate their quality. Our latest study in which a His-tag capture of CD16a and CD64 had been investigated, revealed however that an anti-His antibody-mediated capture might introduce kinetic artifacts (Dorion-Thibaudeau et al. 2014). Therefore, we have chosen to investigate the appropriateness and the potential benefits of another approach relying on the strong interaction between biotin and streptavidin in order to capture the receptor ectodomain onto the biosensor surface in a more stable and oriented manner.

We first here explored the production of site-specific biotin-tagged Fc $\gamma$ R ectodomains. Our biotinylated receptor production strategy relied on the co-transfection of mammalian cells with plasmids encoding a Fc $\gamma$ R ectodomain fused to a biotin acceptor peptide (BAP) and the BirA enzyme. This approach that will be hereafter referred to as in-cell biotinylation, was compared to the in vitro enzymatic biotinylation using recombinant BirA for biotinylation level and overall receptor yields. The resulting biotinylated Fc $\gamma$ Rs were then tested for the development of SPR assays aiming at evaluating IgGs with various glycosylation patterns.

## 5.2.3 Materials and Methods

### 5.2.3.1 Fcγ receptor ectodomain production

#### 5.2.3.1.1 Plasmids and DNA

The codon-optimized sequence encoding the human ectodomain of CD16a (residues 1 to 193) linked to a TEV cleavage site followed by a histidine tag was previously synthesized (GeneArt) and cloned into the pTT5 vector. The resulting plasmid pTT5-CD16aTEVHis was digested with BamHI and AgeI to remove the TEV cleavage site and replace it by insertion of a linker encoding the biotin acceptor peptide (BAP), giving the final plasmid pTT5-CD16aBapHis. The codon-optimized sequences encoding the human ectodomain of CD32a (residues 1 to 206), CD32b (residues 1 to 216), and CD64a (residues 1 to 289) were synthesized by GeneArt, digested with EcoRI and BamHI and cloned into pTT5-CD16aBapHis digested with the same enzyme to remove the CD16a sequence to generate pTT5-CD32aBapHis, pTT5-CD32bBapHis and pTT5-CD64aBapHis plasmids, respectively. The optimized sequence encoding the secreted BirA enzyme (residues 1 to 359 in-frame with the bovine prolactin signal peptide) was synthesized (GeneArt) and cloned into pTT5 vector resulting in the plasmid pTT5-BirA. The pTTo-GFPq plasmid has been described elsewhere (Durocher et al. 2002).

#### 5.2.3.1.2 Mammalian cell culture

The human embryonic kidney 293 cell line, stably expressing truncated EBNA1 protein (HEK293-6E), was cultured in suspension using FreeStyle 17™ medium (Life Technologies, Burlington, ON) supplemented with 4 mM of glutamine, 25 µg/mL of geneticin and 0.1 % (v/v) of Kolliphor® P 188 (Sigma) in a humidified incubator at 37°C with 5 % CO<sub>2</sub>. The Chinese hamster ovary cell line expressing a truncated EBNA1 protein (CHO-3E7) (Raymond et al. 2012), was cultured in the same medium but without geneticin supplementation.

#### 5.2.3.1.3 Co-transfection protocol

To determine the amount of BirA plasmid needed for the production of biotin-tagged FcγRs, six different DNA ratios were used for transient transfection. HEK293-6E (CD16a; CD32a; CD32b) or CHO-3E7 (CD64) cells were first distributed in 6-well plates at  $1.9 \times 10^6$  cells/mL in 1.8 mL medium. For the low affinity receptors, transfection mixtures were then prepared as

follows: 2 µg of plasmids (25 % w/w pTT5-CD16BapHis or pTT5-CD32a(b)BapHis, 5 % pTTo-GFP, 0 – 3 % pTT5-BirA and 70 – 67 % ssDNA) were diluted in 100 µL F17 medium, and 100 µL F17 medium containing 6 µg of 25 kDa linear PEI was added. For the high affinity receptor, transfection mixtures were prepared as follows: 2 µg of plasmids (50 % w/w pTT5-CD64BapHis, 15 % pTT22-AKT-DD, 5 % pTTo-GFP, 0 – 3 % pTT5-BirA and 30 – 27 % ssDNA) were diluted in 100 µL F17 medium, and 100 µL F17 medium containing 10 µg of polyethylenimine max (PEI<sub>max</sub>; Polysciences, Warrington, PA) was added. The mixtures were immediately vortexed and incubated for 5 min (or 15 min for CD64) at room temperature prior to addition to the cells. One day post-transfection (dpt), TN1 peptone was added to the cell suspension in order to reach a final concentration of 0.5 % (w/v) for CD16a, CD32a and CD32b. For CD64a, cells were fed with TN1 peptone 1 % (w/v) and valproic acid (1 mM) at 1 dpt and the temperature was shifted to 32°C to enhance protein production (Furukawa and Ohsuye 1998; Sunley et al. 2008).

#### 5.2.3.1.4 Western blot analysis

Samples were loaded with SDS onto a non-reducing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after 5 dpt. Proteins were transferred to a 0.2-µm Protran® nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, USA) using Tris-glycine as a buffer for 1 h at 300 mA. The membranes were incubated 30 min in blocking reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), and then probed with streptavidin-HRP (BD Bioscience, Mississauga, ON) or anti-histidine-HRP (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) for 1 h. Detection was performed using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics) and a Gel Doc<sup>TM</sup> imaging system (Bio-Rad, Mississauga, ON).

#### 5.2.3.1.5 Production and purification

Scale-up production of the CD32a, CD32b and CD64 receptors, was performed using 500-mL cell cultures in 2-L shake flasks at 120 rpm with 3 % (w/w) BirA plasmid. For CD16a, two batches were produced. The transfections were performed as described above using 0 % and 3 % (w/w) BirA plasmid (no biotinylation and in-cell biotinylation, respectively). For each culture, the ectodomain was purified 5 dpt by immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) as described by Tom and colleagues (Tom et al. 2008) and aggregates removal was performed by preparative size-exclusion chromatography as described elsewhere (Dorion-Thibau deau et al. 2014). Purified receptors were quantified by absorbance at 280 nm using a Nanodrop<sup>TM</sup> spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI) based on their respective molar

extinction coefficients. SDS-PAGE was performed by adapting the protocol described by Boucher and colleagues (Boucher et al. 2008).

#### 5.2.3.1.6 *In vitro* biotinylation

Purified non-biotinylated CD16a-BAP ectodomain was used for BirA mediated *in vitro* biotinylation. The enzymatic reaction was performed using the BirA-500 kit following the manufacturer recommendations (Avidity, Aurora, CO). Briefly, the biotinylation was performed at 37°C for 2 h by mixing CD16a-BAP (50 µM, 1.6 mL), Biomix-A (200 µL), Biomix-B (200 µL) and BirA enzyme (20 µL). Purification of the ectodomain and aggregate removal were carried out as mentioned above.

#### 5.2.3.1.7 Biotinylation quantification of the various Fcγ receptor pools

The percentage of biotinylation was determined using Pierce® Avidin Agarose beads (Thermo Scientific, Rockford, IL) by indirect measurement. Biotin-saturated beads were obtained by mixing 25 µL of D-biotin (500 µM, Avidity, Aurora, CO) with 50 µL of avidin beads (50 % (v/v)). To remove the excess of biotin, the bead slurry was washed 3 times in PBS. The beads (Avi) and the biotin-saturated beads (Avi-B) were then individually mixed with 0.3 µg of FcγR for 15 min and then centrifuged at 500 × g for 1 min, in duplicates. The supernatants were loaded onto a non-reducing Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ SDS-PAGE (Bio-Rad, Mississauga, ON) and the intensity of the bands corresponding to CD16a (*I*) was measured with the Image Lab software (Bio-Rad). This procedure allowed for the calculation of the percentage of biotinylation according to the equation:

$$\text{Biotinylation ( \% )} = \frac{(I_{\text{Avi-B}} - I_{\text{Avi}})}{I_{\text{Avi-B}}} * 100$$

#### 5.2.3.1.8 Immunoglobulin G production

For this study, Trastuzumab (TzM), a humanized mouse IgG1 was selected as our reference antibody. Non-glycosylated TzM (TzM-NG) corresponded to a modified TzM where the Fc N-glycosylation site was eliminated by mutating Asparagine 297 to a Glutamine. TzM and TzM-NG were produced by transient co-expression of the heavy and light chains in CHO-3E7 (Raymond et al. 2012). TzM glycoform being enriched in galactose (TzM-gal) was obtained by co-expressing

of the human beta 1,4-galactosyltransferase (Raymond et al, accepted manuscript). Antibody purification and aggregate removal were performed as described elsewhere (Dorion-Thibaudeau et al. 2014).

#### 5.2.3.1.9 *Glycosylation profile analysis*

TZM glycoforms analysis was performed by trypsin and PNGaseF digestions followed by a matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) assay as previously described (Dorion-Thibaudeau et al. 2014). As expected, mass spectrometry analysis of the various glycan pools corresponding to our different versions of TZM, confirmed the expected differences in N-glycan profiles and were in agreement with previously reported profiles corresponding to other TZM samples we had prepared according to the same protocols (Dorion-Thibaudeau et al. 2014).

#### 5.2.3.2 **Analytical ultracentrifugation analysis**

Sedimentation velocity analyses were performed using a Proteomelab XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Runs were carried out using 2-channel centerpieces (Beckman Coulter) and an 8-hole AN50 Ti analytical rotor pre-equilibrated to 25.0°C. The assay was conducted with an absorbance detection at 280 nm, a radial scan increment of 0.003 cm, an angular velocity of 50 000 rpm and a temperature of 25.0°C. The data were analyzed by applying the continuous  $c(s)$  distribution model in SEDFIT (version 14.3e). The bottom position was fixed to 7.2 cm but the meniscus and frictional ratio varied as fitted parameters. The sedimentation coefficient range was set between 0 and 15 with a confidence level (F-ratio) of 0.68. The corresponding figure (Figure 3) was generated with the GUSI software (version 1.0.8d).

#### 5.2.3.3 **Surface plasmon resonance analysis**

All SPR experiments were performed using a Biacore T100 instrument (GE Healthcare) at a flow rate of 50  $\mu$ L/min at 25°C using HBS-P 1 $\times$ , pH 7.4 (GE Healthcare) as running buffer. Kinetic analysis was performed with the Biacore T100 Evaluation software. The Biotin CAPture kit (GE Healthcare) was used to stably capture biotinylated Fc $\gamma$ R at the surface of the biosensor, according to the manufacturer recommendations. The CAP chip (included with the kit) consisted of carboxymethylated dextran surface pre-coated with single-stranded DNA (ssDNA). The procedure consisted of a first capture that was performed by injecting a macromolecular complex



composed of a complementary ssDNA attached to a streptavidin ( $\approx 3500$  RU). Biotin-tagged low affinity receptors were captured over the streptavidin surface at a flow rate of  $10 \mu\text{L}/\text{min}$  for 1 min ( $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 100 RU) and CD64 was captured using the same flow rate for 45 s ( $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 40 RU) while no receptor was injected over the reference surface. Mab solutions were then injected over captured CD16a, CD32a, CD32b ( $10, 30, 100, 300, 500, 1000$  nM, 2 min) and CD64 ( $1, 3, 10, 30, 100$  nM, 1 min) and control surfaces. The receptor/IgG dissociation was monitored by injecting running buffer for 5 min or 12 min for CD64. Surface regeneration (dissociation of complementary ssDNA-streptavidin from the ssDNA surface) was performed by injecting the regeneration solution included with the kit ( $6 \text{ M}$  guanidine-HCl,  $0.25 \text{ M}$  NaOH). Data were double-referenced prior analysis (Myszka 1999).

## 5.2.4 Results

### 5.2.4.1 *In-cell* biotinylation of Fc $\gamma$ receptors by co-transfection of BirA in mammalian cells

Plasmids corresponding to the BirA enzyme and to the extracellular portion of CD16a, CD32a, CD32b or CD64, all tagged with the biotin acceptor peptide (BAP) sequence in addition to ten histidine residues at their C-terminus, were used to produce biotin-tagged Fc $\gamma$ R ectodomains by transient co-transfection of mammalian cells. For co-transfection, different ratios of BirA plasmid within the co-transfection mix were tested ( $1 - 3 \%$  (w/w)) to define the amount needed in order to get the best compromise between receptor production and biotinylation. For all tested conditions, the supernatants were collected five days post-transfection and run on non-reducing SDS-PAGE gels, which were then analyzed by Western blots using anti-histidine-HRP antibody and streptavidin-HRP as probes (Figure 1). For CD16a and CD64, each supernatant was characterized by the presence of a smear that most likely corresponded to aggregates (the molecular weight of monomeric CD16a and CD64 was calculated to be around  $25 \text{ kDa}$  and  $35 \text{ kDa}$ , respectively, without taking biotinylation and glycosylation into account). The anti-histidine probe revealed that the addition of BirA plasmid in the DNA preparation decreased the overall receptor production level (Figure 1 panels A1, B1, C1). Western blots corresponding to the use of streptavidin as a probe showed no band when the BirA plasmid had not been added in the transfection mix, as expected since this enzyme is absolutely needed for BAP biotinylation (Beckett et al. 1999) (Figure 1, panels A2, B2, C2). In contrast to decreasing Fc $\gamma$ Rs expression when increasing BirA plasmid amounts (as observed with the anti-Histidine-HRP probe), levels of Fc $\gamma$ R

biotinylation, were higher when increasing BirA plasmid level up to 3 % (as detected with the streptavidin-HRP probe). The presence of 3 % (w/w) of BirA plasmid was thus considered to be the optimal condition for the production of biotinylated receptors since this amount allowed obtaining a high level of biotinylation without decreasing drastically the overall production yield (significant decrease in Fc receptors expression was observed with higher BirA plasmid percentages - data not shown). This experimental condition was then selected for larger-scale (500 mL) production, which was followed by receptor purification by IMAC. Non-reducing SDS-PAGE gels were run with samples corresponding to each purification step (Figure 2). The last step (size-exclusion chromatography - SEC) yielded an almost pure monomeric form for all receptors as a single band was observed on the gel, matching the molecular weights of the monomeric FcγRs. For CD32a, a light band around 25 kDa was also observed, which likely corresponded to the non-glycosylated form of the receptor (Figure 2B). The overall yields of purified CD16a, CD32a/b and CD64 and their percentage of biotinylation (determined with a commercial assay kit relying on the use of avidin beads) are given in Table 1.

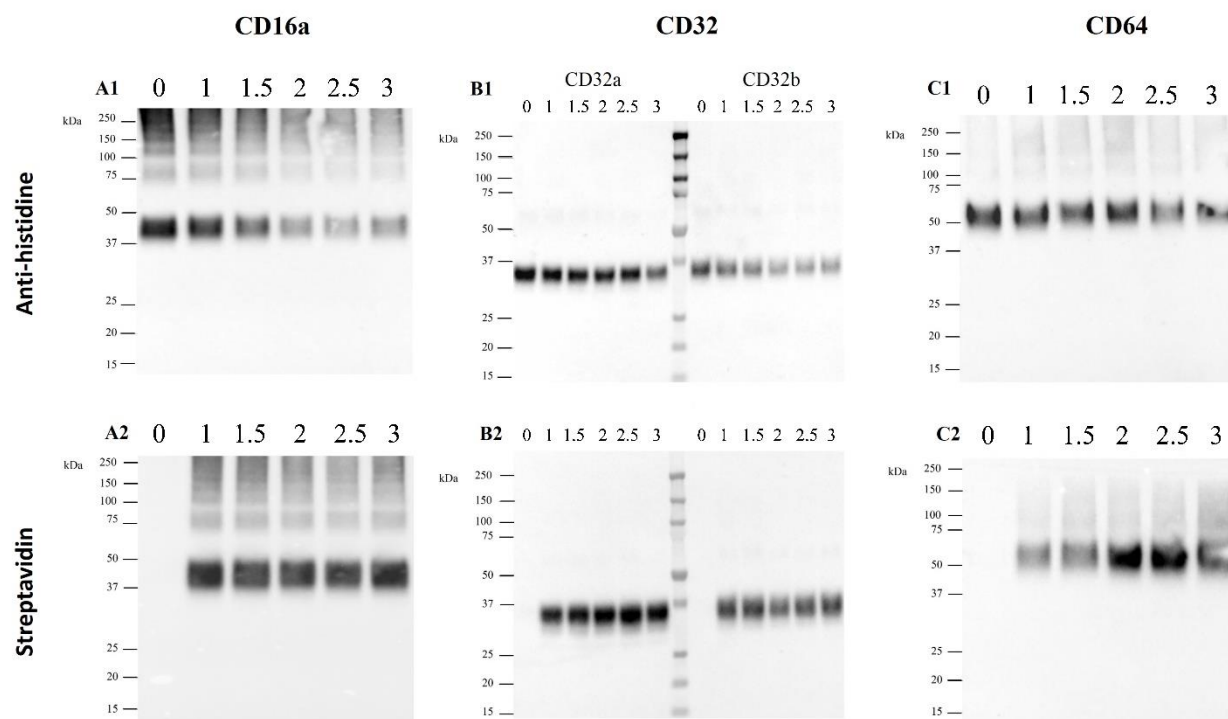


Figure 5-1 : Western blots of supernatants corresponding to CD16a (A), CD32a (B), CD32b (B) and CD64 (C) using 0 – 3 % (w/w) BirA plasmid, probed with either anti-histidine (1) for total receptor production or streptavidin (2) for biotinylation level.

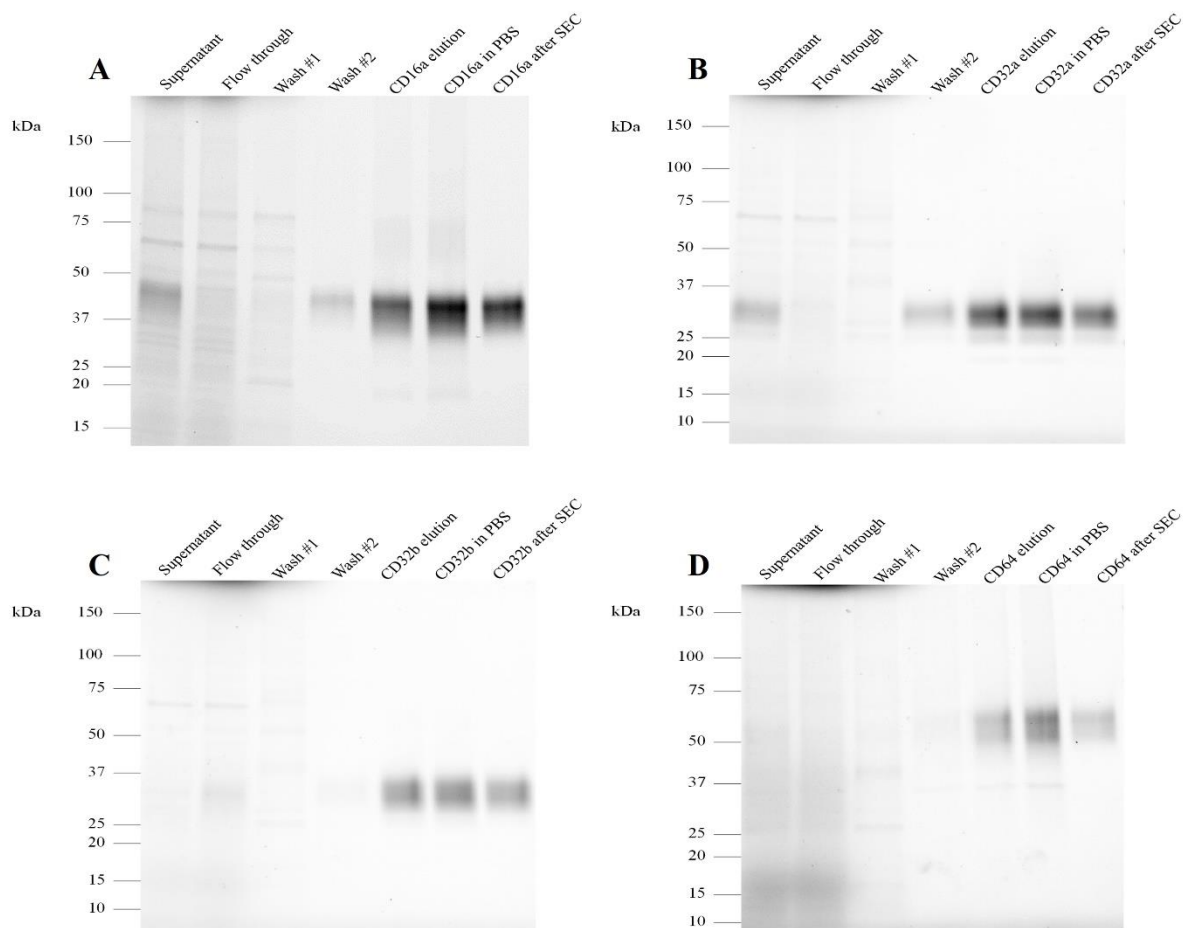


Figure 5-2 : Coomassie staining of non-reducing SDS-PAGE gels corresponding to the production of biotinylated CD16a, CD32a, CD32b and CD64 ectodomains. 18  $\mu$ L of sample corresponding to each purification step were loaded while 2 - 3  $\mu$ g of proteins from the elution, PBS wash and SEC pool aliquots were loaded onto the gel.

Table 5-1 : CD16a production: Final titers post-purification and biotinylation levels

	<b>Titer (mg/L culture)</b>	<b>Biotinylation ( %)</b>
CD16a <i>no biotin</i>	15.9	-
<i>In-cell</i> CD16a	13.9	88
<i>In vitro</i> CD16a	9.4	78
<i>In-cell</i> CD32a	12.0	68
<i>In-cell</i> CD32b	4.6	72
<i>In-cell</i> CD64	0.6	64

#### 5.2.4.2 Influence of the biotinylation method on CD16a yields

Since the addition of the BirA plasmid to the transfection mix decreased the yield of total CD16a expression and, to some extent that of other receptor ectodomains (Figure 1, panels A1-C1), we next evaluated the utility of the co-transfection approach by comparing it to a standard in vitro enzymatic biotinylation protocol using commercially available BirA (latter designated as the in vitro protocol in this manuscript). That is, we first produced and affinity purified BAP-tagged CD16a; the purified protein was then biotinylated in vitro by addition of BirA and its substrate. The mixture was then passed on an IMAC column to separate the biotinylated protein from the BirA enzyme and unreacted substrate. The biotinylation levels were 88 % and 78 % and the titers were 13.9 mg and 9.4 mg per liter of medium for the in-cell approach and in vitro approach using 20 µg of BirA enzyme (200 000 units), respectively (Table 1). Very similar results were obtained when additional production runs were performed (data not shown).

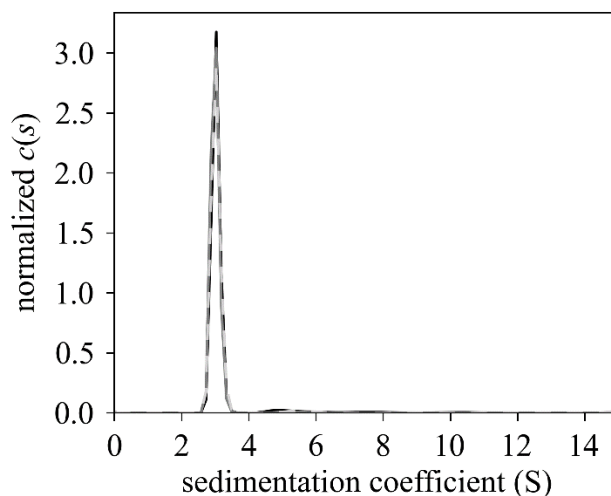


Figure 5-3 : Sedimentation coefficient distribution of *in-cell* (black), *in vitro* (gray) and biotin-free (dashed gray) CD16a at 50 000 rpm.

#### 5.2.4.3 Surface plasmon resonance kinetics experiments

Since our goal was to develop a high-throughput SPR assay to characterize the interactions between FcγRs and antibodies harbouring various glycosylation patterns, our strategy was to immobilize the receptor ectodomains onto several biosensor surfaces. Our approach relied on the tethering of a sensor surface-bound streptavidin for the subsequent stable capture of the biotinylated FcγR ectodomain in an oriented fashion.

Based on this strategy, real-time monitoring of the interactions between CD16a and TzM was achieved by performing duplicate injections of TzM at concentrations ranging from 10 to 1000 nM. A first series of experiments was conducted with biotinylated CD16a that was produced by *in-cell* co-transfection. As can be seen in Figure 4, the baseline was stable before the injection of the analyte, and, at the end of the dissociation, the signal went back to 0 response units (RU). This indicated that the capture of the biotinylated receptor via streptavidin was very stable and that the CD16a/IgG complex dissociated within less than 300 s. Moreover, duplicate injections were practically superimposed, thus further validating the approach, more specifically the reproducibility of the streptavidin and receptor ectodomain captures. For comparison with values reported in the literature, global fit (Figure 4) and steady-state affinity analyses (Inset in Figure 4)

of the resulting sensorgrams were performed, assuming a Langmuirian 1:1 interaction (Table 2). The same protocol was then applied to compare both versions of biotinylated CD16a (corresponding to in-cell or in vitro biotinylation). As can be seen in Figure 5, the injection of 1000 nM of TZM over both receptor surfaces gave identical normalized sensorgrams (duplicates injections), which suggested that the biotinylation protocol did not influence the ability of the biotinylated receptor to interact with a given IgG.

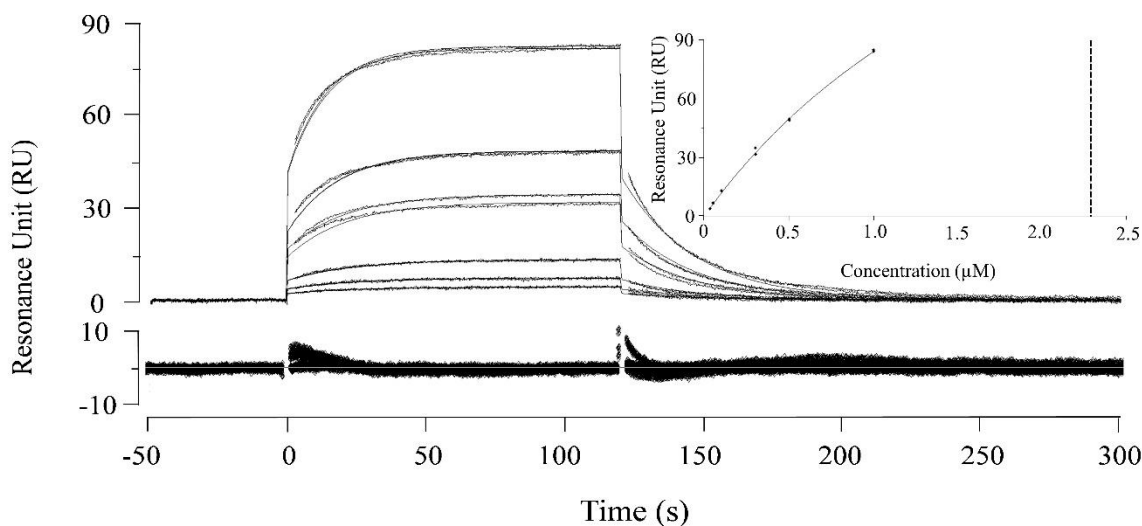


Figure 5-4 : Sensorgrams corresponding to the interactions between injected control TZM (10, 30, 100, 300, 500, 1000 nM, duplicate injections) and biotinylated CD16a that had been captured by streptavidin. Double-referenced sensorgrams were globally fit (corresponding residuals shown in the bottom panel) and a steady-state analysis was also performed (inset) both assuming a 1:1 simple model interaction. Note that in the inset, the vertical dashed line corresponds to the KD value derived from the steady-state analysis.

Table 5-2 : Kinetics parameters related to the interactions of CD16a with reference TZM (Figure 4)

	Global fit (1:1)	Steady-state affinity (1:1)
$k_a$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$(2.94 \pm 0.03) \times 10^4$	-
$k_d$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$0.03 \pm 1.50 \times 10^{-4}$	-
$K_D$ (M)	$(1.02 \pm 0.02) \times 10^{-6}$	$(2.29 \pm 0.27) \times 10^{-6}$
$R_{\max}$ (RU)	$90.7 \pm 0.7$	$272 \pm 23$
$\chi^2$	0.313	0.928

The same SPR strategy was used to monitor CD64/TZM interactions. Mab injections with concentrations ranging between 1 – 100 nM were performed in duplicate as seen in Figure 6. For each sensorgram, the baseline was stable before analyte injection, thus indicating a stable CD64 capture via previously captured streptavidin. A global fit of the sensorgrams was performed assuming 1:1 interaction (Figure 6, Table 3).

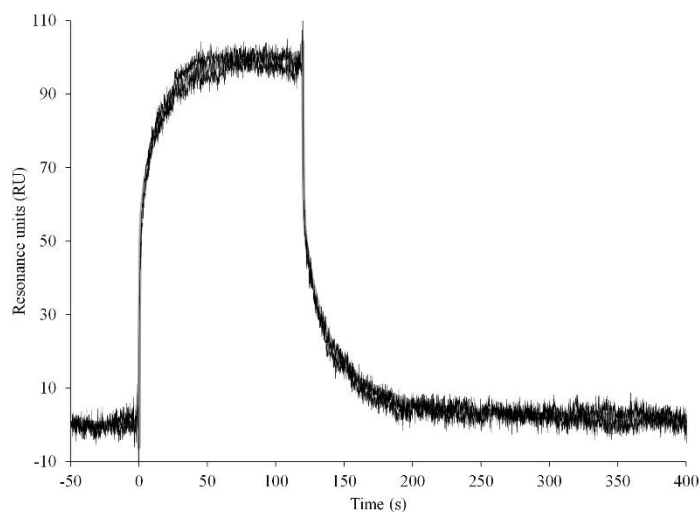


Figure 5-5 : Sensorgrams corresponding to the injection of TZM at 1000 nM over *in-cell* (black) and *in vitro* (gray) CD16a, both in duplicates.



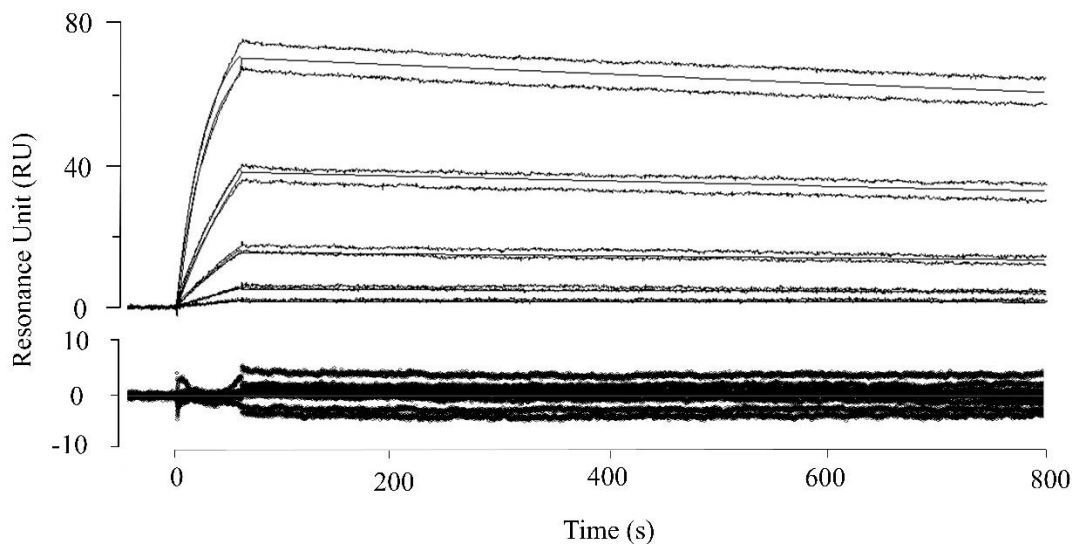


Figure 5-6 : Sensorgrams corresponding to the interactions between reference TZM (10, 30, 100, 300, 500, 1000 nM, duplicate injections) and biotinylated CD64 captured by streptavidin. Double-referenced sensorgrams were globally fit assuming 1:1 simple model (corresponding residuals shown in the bottom panel).

Table 5-3 : Kinetic and Thermodynamic parameters related to the interactions of CD32a, CD32b and CD64 with reference TZM (Figures 6 & 7)

	CD32a	CD32b	CD64
	Steady-state affinity (1:1)		Global fit (1:1)
$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	-	-	$(3.63 \pm 0.01) \times 10^5$
$k_d$ ( $s^{-1}$ )	-	-	$(1.98 \pm 0.03) \times 10^{-4}$
$K_D$ (M)	$(0.60 \pm 0.03) \times 10^{-6}$	$(1.66 \pm 0.24) \times 10^{-6}$	$(0.55 \pm 0.06) \times 10^{-9}$
$R_{max}$ (RU)	$77.7 \pm 1.9$	$140 \pm 13$	$80.1 \pm 0.1$
$\chi^2$	0.309	0.823	3.86

Finally, the same capture approach was applied to biotinylated CD32a-BAP and CD32b-BAP, following which, injections of TZM at concentrations ranging from 10 – 1000 nM were performed (Figure 7, duplicate injections). Again, the capture of the biotinylated receptor ectodomains on the streptavidin surface was observed to be very stable before analyte injection for both CD32a (Figure 7A) and CD32b (Figure 7B). As expected for both receptors, the interactions with TZM were

characterized by fast association and dissociation rates. Therefore, steady-state analysis only was performed for each set of sensorgrams in order to estimate the thermodynamic dissociation constant of each interaction (Insets in Figure 7, Table 3).

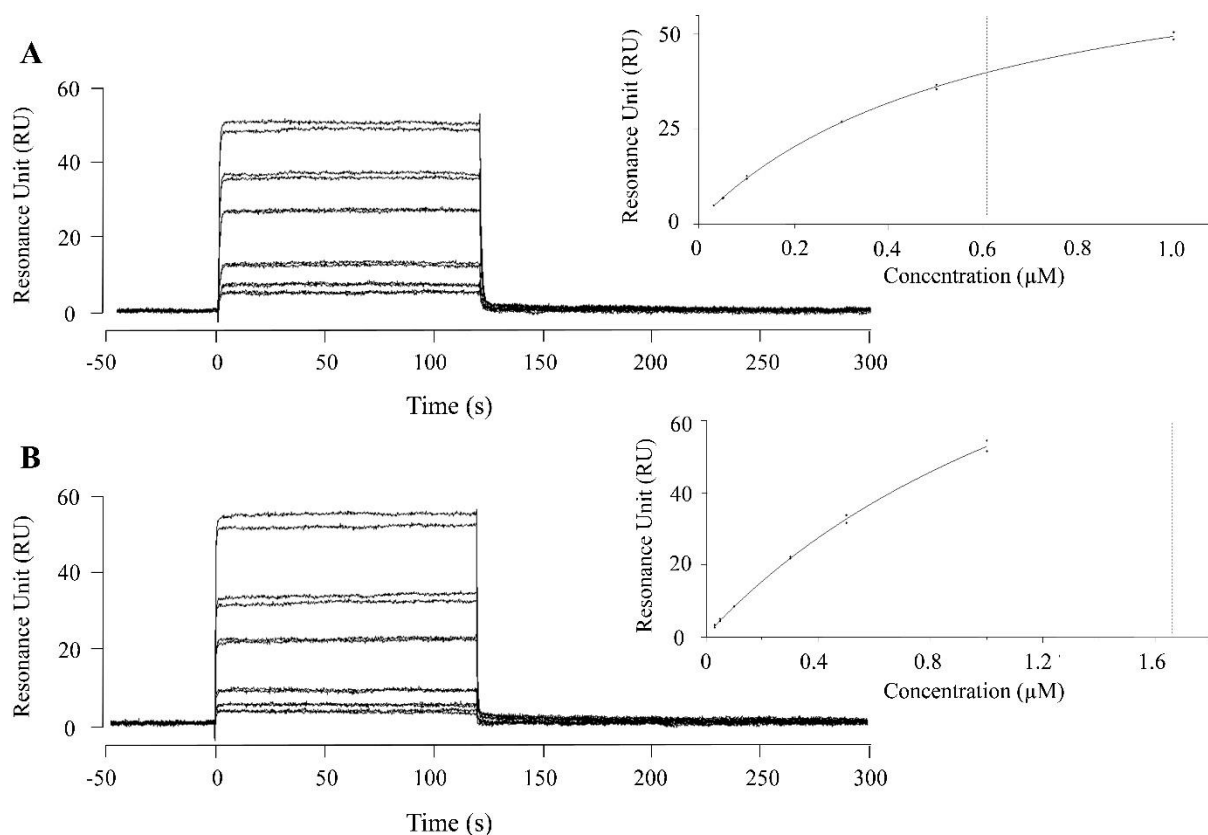


Figure 5-7 : Sensorgrams corresponding to the interactions between reference TZM (10, 30, 100, 300, 500, 1000 nM, duplicate injections) and biotinylated CD32a (A) or CD32b (B) captured by streptavidin. Double-referenced sensorgrams were analyzed by a steady-state analysis (see insets). Note that in the insets, the vertical dashed lines correspond to the  $K_D$  values derived from the steady-state analyses.

The SPR assays corresponding to the oriented capture of biotinylated CD16a and CD64 by means of a previously tethered streptavidin at the biosensor surface were also evaluated for their ability to detect differences within TZM glycosylation profiles. In that endeavor, injections of our reference TZM, in addition to TZM-gal (a TZM preparation containing high galactosylation levels, that is,

11 % G1F and 66 % G2F while G0F was found at 5 % by HILIC, data not shown) and TzM-NG (a mutated TzM that is not glycosylated) (Dorion-Thibaudeau et al. 2014) were performed. Duplicate injections of each of these TzM preparations were performed at 1000 nM over a streptavidin-bound CD16a surface (Figure 8 A) or at 300 nM over a streptavidin-bound CD64 surface (Figure 8 B). Double-referenced normalized sensorgrams are shown in Figure 8. Of interest, the different TzM glycoforms interacting with CD16a were characterized by different dissociation profiles: dissociation of the IgG/CD16a complexes was complete only after 250 and 300 s for TzM and TzM-gal, respectively. As expected, TzM-NG did not interact with CD16a. In the case of immobilized CD64, TzM-NG binding to CD64 was observed: the kinetics corresponding to the aglycosylated Mab were however strikingly different from those observed with our reference glycosylated TzM. For TzM-gal, similar binding to that of the reference TzM was observed when interacting with CD64.

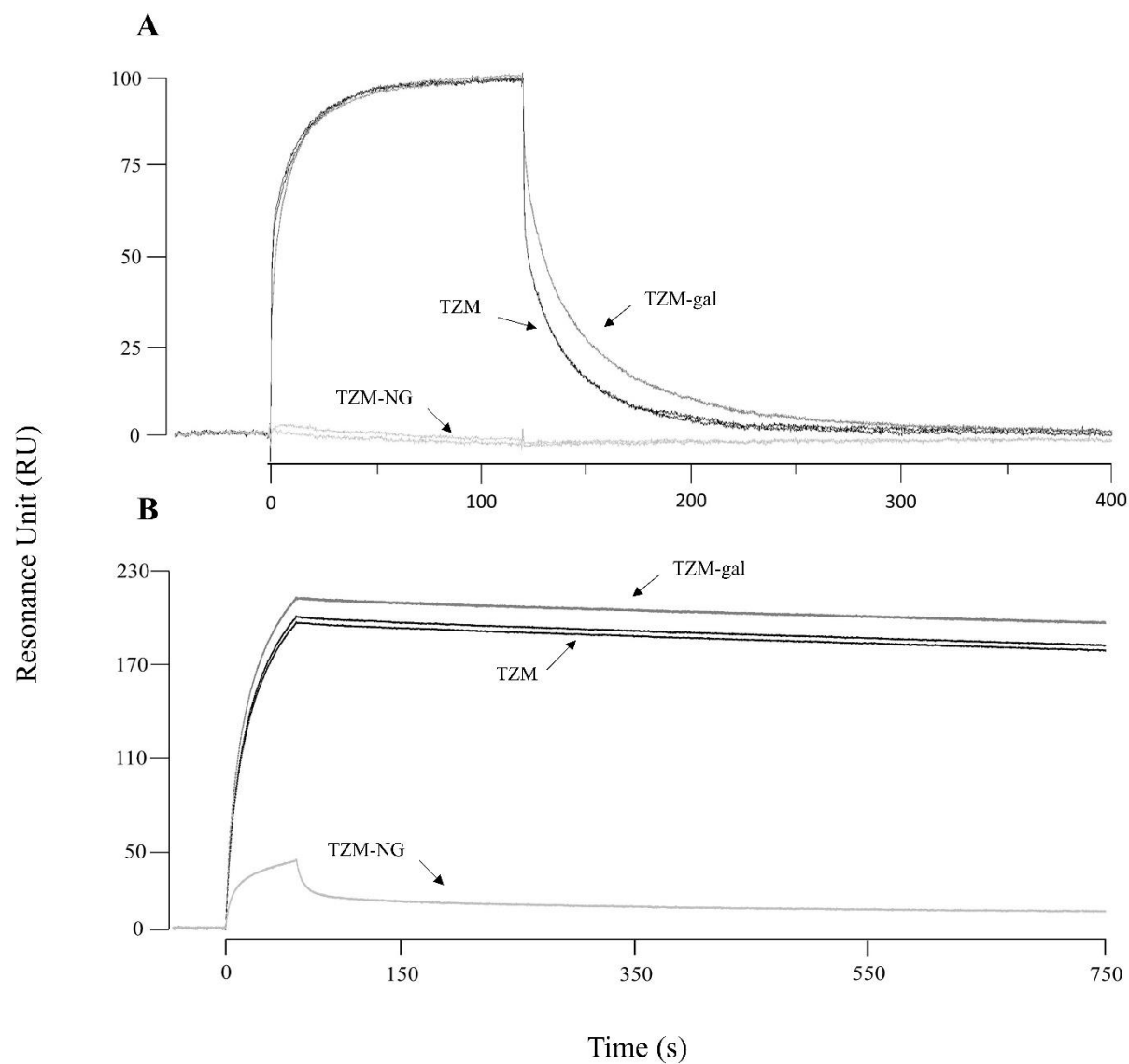


Figure 5-8 : Sensorgrams corresponding to the injection of reference TZM (black), TZM-NG (light gray), TZM-gal (dark gray) at 1000 nM over CD16a (A) or at 300 nM over CD64 (B), in duplicates.

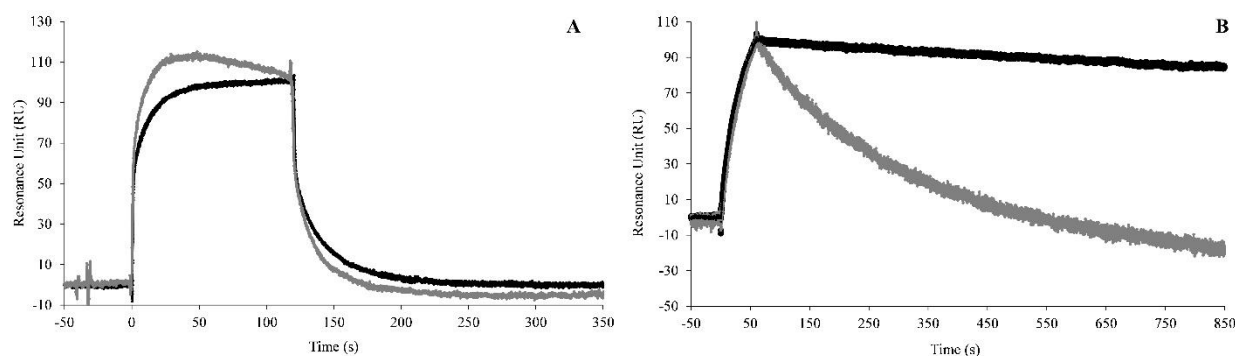


Figure 5-9 : Normalized sensorgrams corresponding to the injection of 1000 nM of control TZM over CD16a (Panel A) or CD64 (Panel B) that had been captured via a His-tag protocol(Dorion-Thibaudeau et al., 2014) (gray curves) or via biotin-streptavidin interactions (black curves, this study).

## 5.2.5 Discussion

### 5.2.5.1 *In-cell* biotinylation of Fcγ receptors

We here report for the first time an efficient biotinylation protocol applied to Fcγ receptor ectodomains. This protocol relies on the transient co-transfection of mammalian cells with two distinct plasmids: one corresponding to the secreted BirA enzyme and the other to the protein of interest being fused at its C-terminus to a BAP sequence. We demonstrated that this approach was advantageous when compared to the standard *in vitro* biotinylation procedure, as the latter requires both FcγR and BirA enzyme to be purified, while additional affinity purification is necessary to remove BirA and reaction components from the biotinylated receptor preparation.

*In-cell* biotinylation has been previously described in several research articles using a single vector coding for both the secreted BirA enzyme and the protein of interest (Predonzani et al. 2008; Viens et al. 2008). That methodology, however, does not permit to fine-tune the ratio between BirA and the protein of interest; based on our current observations, these amounts need to be adjusted for optimal performance (Figure 1). It is more likely that the optimal ratio of BirA/BAP-tagged protein will depend on the protein to be biotinylated; these adjustments would be uneasy to perform with a single-vector strategy.

Biotin-free and *in-cell* biotinylated receptor were produced at the 500-mL culture scale (with 0 % and 3 % BirA plasmid, respectively) and subsequently purified to get monomeric CD16a ectodomains (Figure 2A). Biotin-free CD16a was then used as a substrate for *in vitro* biotinylation to compare the final overall titer, the percentage of biotinylation, the sedimentation coefficient (by AUC) and the kinetics of binding to Trastuzumab (TZM) - our reference antibody for this study (by SPR). While biotinylation levels were found to be similar for the *in-cell* and *in vitro* approaches (Table 1), the final receptor yield was higher for the *in-cell* strategy, making it very attractive when considering all other advantages mentioned earlier. A comparison of the c(s) distribution profiles of both biotin-tagged and non-biotinylated CD16a highly suggests that the biotinylation methodologies do not influence the conformation of the protein (Figure 3). This hypothesis is further reinforced by our SPR results indicating that both ectodomains, once captured via their biotin tag, yield identical kinetic profiles for TZM binding (Figure 5). Altogether our results indicate that the *in-cell* biotinylation protocol, compared to a typical *in vitro* biotinylation, is advantageous as it is faster (less purification steps) and cost-effective, while giving significantly higher yields (Table 1) for the same product bioactivity.

#### 5.2.5.2 Surface plasmon resonance assay development

The use of SPR biosensors has been reported by many research groups as a relevant tool to evaluate the kinetic constants of IgG/FcγR interactions. Among these studies, the variety of experimental protocols that were reported (choice of the partner to be immobilized or captured, flow rates and densities) yielded to inconsistencies among reported kinetic values (Bruhns et al. 2009; Galon et al. 1997; Li et al. 2007; Luo et al. 2009; Magistrelli et al. 2012). In many cases, kinetic profiles were observed to deviate from a simple Langmuirian model. These deviations can be attributed to the intrinsic complexity of the biological interactions under study (e.g., heterogeneity within the glycosylation of the antibody and/or receptor preparations) or suboptimal experimental procedures (mass transfer limitation, crowded surfaces, heterogeneous ligand orientation...) that have been extensively discussed by the members of the SPR community over the years (Myszka 1999; Magistrelli et al. 2012). We have shown in a previous study that the oriented capture of CD16a significantly affects its binding kinetics when compared to the same ectodomain being randomly immobilized, most likely because the random immobilization approach resulted in heterogeneous receptor populations at the biosensor surface (Dorion-

Thibaudeau et al. 2014). In that study, the oriented capture of CD16a was mediated by His-tagged CD16a binding to an anti-His antibody that had been previously immobilized at the SPR biosensor surface. This capture protocol was however shown to have its own weaknesses. That is, a yet unexplained transient maximum followed by a decrease (rather than a stable plateau) was observed during the injection phase of our reference TZM over captured CD16a (Figure 9). Such an atypical behaviour was also observed by others (Luo et al. 2009; Zeck et al. 2011). Moreover, the anti-histidine capture approach we tested was not suitable for CD64 since, at high TZM concentrations, the response signal was negative at the end of the dissociation phase (Figure 9). We postulated at that time that such phenomena could be due to the fact that antibody binding to Fc $\gamma$ R might weaken the anti-His antibody/Fc $\gamma$ R interaction or, alternatively, that the anti-His antibody competed with the injected antibody for Fc $\gamma$ R binding. We reasoned that, in either case, changing our capture strategy to an approach relying on a strong interaction that does not involve any antibody might solve the issues and thus allow for a better kinetic characterization. This motivated the biotin capture presented here as a robust alternative to the use of a His-tag capture antibody. To our knowledge, this experimental approach has never been reported for the capture of Fc $\gamma$ Rs.

Higher flow rate as well as low receptor densities were used in SPR biosensing experiments in order to avoid any mass transport/rebinding artifacts (Myszka 1999) while antibody aggregates were removed prior antibody injection since we demonstrated that as little as 2 % of aggregate within an antibody preparation may significantly affect the kinetic profile of the antibody/CD16a interactions (Dorion-Thibaudeau et al. 2014). As expected, the biotin/streptavidin capture approach we developed lead to the recording of sensorgrams in which the atypical sensorgram shape that had been previously observed for CD16a was not recorded (Figure 9). This assay is thus a significant improvement to the His-tag capture protocols that has been commonly used up to now (Dorion-Thibaudeau et al. 2014; Luo et al. 2009; Zeck et al. 2011). A global analysis of the SPR data corresponding to CD16a interactions with TZM (Figure 4) was performed to determine the kinetic constants, and thus calculate the apparent thermodynamic dissociation constant ( $K_D$ ) of the interaction. In spite of all the precautions we took to eliminate any unwanted artifacts that may bias our kinetic interpretation of the data, the CD16a interactions with TZM were still observed to deviate from a simple model, as one can deduce from visual inspection (Figure 4). This deviation is thus most likely due to the fact that TZM glycosylation was not homogenous in the preparation, as determined by mass spectrometry (Dorion-Thibaudeau et al. 2014). Each TZM subpopulation

may thus be characterized by a distinct set of kinetic constants when interacting with CD16a. This hypothesis is supported by our SPR results corresponding to TZM harboring different glycosylation profiles (see below).

Since we reached equilibrium at the end of each TZM injection (plateau), a steady-state analysis was also performed to determine the apparent  $K_D$  of the interaction (Inset in Figure 4). The latter was 2-fold larger than the one calculated by the ratio of the kinetic rates (global fit, Table 2). A 3-fold difference was also observed for the  $R_{max}$  values that were determined with both approaches, highly suggesting that these observed discrepancies are due to the fact that the TZM concentrations we injected were too low for an accurate  $R_{max}$  and  $K_D$  determination by a steady-state analysis. However, it is important to note that the apparent  $K_D$ , emanating from both global fit and steady-state analyses (Table 2) are within the same order of magnitude as those previously reported (Dorion-Thibaut et al. 2014; Lu et al. 2011; Radaev and Sun 2002).

The biotin capture approach has also improved the quality of the sensorgrams corresponding to the interaction between CD64 and TZM. The observed classical shape is indeed contrasting with our previous results corresponding to the anti-His CD64 capture strategy (negative net responses were observed during the dissociation phase, Figure 9). A global analysis of the sensorgrams corresponding to CD64 interaction with TZM (Figure 6) was performed to determine the kinetic constants of the interactions, and calculate the apparent thermodynamic dissociation constant ( $K_D$ , Table 3). The latter is also in agreement with values from the literature (Lu et al. 2011; Patel et al. 2013).

Kinetic experiment using CD32a and CD32b interacting with TZM were also performed with this new capture protocol (Figure 7). Once again the transient maximum we previously observed with the anti-His capture approach (unreported results) were absent. The fast rates of the interactions in both the analyte and buffer injection phases, lead us to evaluate the  $K_D$  of the interaction using a steady-state type of analysis only (Table 3). Again, we obtained values that are in agreement with the literature (Maenaka et al. 2001). TZM injections at higher concentrations would however be needed for a more accurate ( $K_D$ ,  $R_{max}$ ) determination for these receptors since apparent  $K_D$ s were in both cases close or higher than the maximal concentration of TZM we injected (Figure 7).

Of interest, in spite of the deviations from a simple kinetic model we observed with captured CD16a and CD64 (via biotin/streptavidin interactions), both ectodomains were proven to be valuable to



distinguish various glycoforms of TzM based on a visual inspection of their binding kinetics (more precisely differences in the dissociation profiles, Figure 8), in excellent agreement with the literature (Dorion-Thibaudeau et al. 2014; Houde et al. 2010; Krapp et al. 2003; Leader et al. 1991; Walker et al. 1989). On that note, according to the results reported in Figure 8, Mab binding to CD16a and CD64 receptor ectodomains is impacted in a different fashion depending on Mab glycosylation profile. The simultaneous use of distinct surfaces displaying streptavidin-captured CD16a and CD64 may thus provide a good semi-quantitative analysis of the glycoprofile of a given pool of Mabs by SPR. That is, while the dissociation profiles recorded on CD16a surfaces may allow for the detection of different Mab glycoforms (as observed for highly galactosylated and reference Mabs, Figure 8A), the CD64 surface is efficient in detecting aglycosylated Mabs within a given pool since their dissociation profile strikingly contrasts with those of glycosylated Mabs (Figure 8B). Our group is currently working at generating a larger panel of Mab glycoforms in order to correlate their SPR kinetic signature when interacting with Fc $\gamma$ R ectodomains (this assay) to their therapeutic efficacy as evaluated in *in vitro* cell assays.

### 5.2.6 Conclusion

We have developed an efficient protocol for *in-cell* protein biotinylation by transient BirA co-transfection in mammalian cells that we successfully applied to the CD16a, CD32a, CD32b, and CD64 ectodomains. This innovative methodology is faster and yields similar biotinylation level compared with a typical *in vitro* biotinylation. Biotin-tagged Fc $\gamma$ Rs were subsequently used for the development of SPR surfaces to perform real-time monitoring interactions with Mabs. Our results demonstrated that, even with an optimized experimental setup, CD16a still exhibits complex kinetics of interactions with Mabs, more likely due to heterogeneity within the pools of Mabs we tested. Nevertheless, the biotin tag capture approach we here report is promising for the setup of SPR assays aiming at assessing the glycosylation profile of the Mab. These SPR assays may be used as part of a high-throughput routine for quality control/characterization in a Mab screening platform in order to predict Mab therapeutic efficacy.

### 5.2.7 Acknowledgements

The authors would like to thank Louis Bisson, Brian Cass, and Christian Gervais for their help with protein production and purification at NRC and also Erika Lattová and Dr. Hélène

Perreault (University of Manitoba) for glycosylation analysis. This work was supported by the NSERC Strategic Network for The Production of Single-type Glycoform Monoclonal Antibodies (MabNet) group.

### 5.2.8 References

- Beckett D, Kovaleva E, Schatz PJ. 1999. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Prot Sci* 8(4):921-9.
- Boucher C, St-Laurent G, Loignon M, Jolicoeur M, De Crescenzo G, Durocher Y. 2008. The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags. *Tissue engineering. Part A* 14(12):2069-77.
- Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M. 2009. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113(16):3716-25.
- Dorion-Thibaudeau J, Raymond C, Lattova E, Perreault H, Durocher Y, De Crescenzo G. 2014. Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J Immunol Methods* 408:24-34.
- Durocher Y, Perret S, Kamen A. 2002. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 30(2):E9.
- Durocher Y, Butler M. 2009. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 20(6):700-7.
- Ferrara C, Grau S, Jaeger C, Sondermann P, Bruenker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M and others. 2011. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc gamma RIII and antibodies lacking core fucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(31):12669-12674.
- Furukawa K, Ohsuye K. 1998. Effect of culture temperature on a recombinant CHO cell line producing a C-terminal alpha-amidating enzyme. *Cytotechnology* 26(2):153-64.
- Galon J, Robertson MW, Galinha A, Mazieres N, Spagnoli R, Fridman WH, Sautes C. 1997. Affinity of the interaction between Fc gamma receptor type III (Fc gammaRIII) and monomeric human IgG subclasses. Role of Fc gammaRIII glycosylation. *Eur J Immunol* 27(8):1928-32.

- Houde D, Peng Y, Berkowitz SA, Engen JR. 2010. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics* 9(8):1716-28.
- Jefferis R. 2005. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* 21(1):11-6.
- Kato K, Sautès-Fridman C, Yamada W, Kobayashi K, Uchiyama S, Kim H, Enokizono J, Galinha A, Kobayashi Y, Fridman WH and others. 2000. Structural basis of the interaction between IgG and fc[gamma] receptors. *J Mol Biol* 295(2):213-224.
- Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sondermann P. 2003. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 325(5):979-89.
- Leader KA, Kumpel BM, Hadley AG, Bradley BA. 1991. Functional interactions of aglycosylated monoclonal anti-D with Fc gamma RI+ and Fc gamma RIII+ cells. *Immunology* 72(4):481-5.
- Li P, Jiang N, Nagarajan S, Wohlhueter R, Selvaraj P, Zhu C. 2007. Affinity and kinetic analysis of Fcgamma receptor IIIa (CD16a) binding to IgG ligands. *J Biol Chem* 282(9):6210-21.
- Lu J, Ellsworth JL, Hamacher N, Oak SW, Sun PD. 2011. Crystal structure of Fcgamma receptor I and its implication in high affinity gamma-immunoglobulin binding. *J Biol Chem* 286(47):40608-13.
- Luo Y, Lu Z, Raso SW, Entrican C, Tangarone B. 2009. Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fcgamma receptors. *mAbs* 1(5):491-504.
- Maenaka K, van der Merwe PA, Stuart DI, Jones EY, Sondermann P. 2001. The human low affinity Fcgamma receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem* 276(48):44898-904.
- Magistrelli G, Malinge P, Anceriz N, Desmurs M, Venet S, Calloud S, Daubeuf B, Kosco-Vilbois M, Fischer N. 2012. Robust recombinant FcRn production in mammalian cells enabling oriented immobilization for IgG binding studies. *J Immunol Methods* 375(1-2):20-9.
- Male DK, Roitt Y, Brostoff J. 2007. *Immunologie*. Elsevier Masson.
- Myszka DG. 1999. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12(5):279-84.

Okazaki A, Shoji-Hosaka E, Nakamura K, Wakitani M, Uchida K, Kakita S, Tsumoto K, Kumagai I, Shitara K. 2004. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and Fc gamma RIIIa. *J. Mol. Biol.* 336(5):1239-1249.

Patel R, Johnson KK, Andrien BA, Tamburini PP. 2013. IgG subclass variation of a monoclonal antibody binding to human Fc-gamma receptors. *Am J Biochem Biotechnol* 9(3):206-219.

Pollastrini J, Dillon TM, Bondarenko P, Chou RYT. 2011. Field flow fractionation for assessing neonatal Fc receptor and Fc gamma receptor binding to monoclonal antibodies in solution. *Anal Biochem* 414(1):88-98.

Powell MS, Hogarth PM. 2008. Fc Receptors. *Multichain Immune Recognition Receptor Signaling: From Spatiotemporal Organization to Human Disease*. Berlin: Springer-Verlag Berlin. p 24-34.

Predonzani A, Arnoldi F, Lopez-Requena A, Burrone OR. 2008. In vivo site-specific biotinylation of proteins within the secretory pathway using a single vector system. *BMC biotechnology* 8:41.

Radaev S, Sun P. 2002. Recognition of immunoglobulins by Fc[gamma] receptors. *Mol Immunol* 38(14):1073-1083.

Radaev S, Sun PD. 2001. Recognition of IgG by Fc gamma receptor - The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem* 276(19):16478-16483.

Raymond C, Robotham A, Kelly J, Lattová E, Perreault Hln, Durocher Y. 2012. Production of Highly Sialylated Monoclonal Antibodies. In: (Ed.) DSP, editor. *Glycosylation: InTech*.

Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cal AN, Raju TS. 2007. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol* 44(7):1524-1534.

Scallon BJ, Snyder LA, Anderson GM, Chen Q, Yan L, Weiner LM, Nakada MT. 2006. A review of antibody therapeutics and antibody-related technologies for oncology. *J Immunother* 29(4):351-64.

Shibata-Koyama M, Iida S, Okazaki A, Mori K, Kitajima-Miyama K, Saitou S, Kakita S, Kanda Y, Shitara K, Kato K and others. 2009. The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45:

an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology* 19(2):126-34.

Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SHA, Presta LG. 2002. Lack of Fucose on Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding to Human Fc $\gamma$ RIII and Antibody-dependent Cellular Toxicity. *JBC* 277(30):26733-26740.

Sondermann P, Huber R, Jacob U. 1999. Crystal structure of the soluble form of the human fcgamma-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J* 18(5):1095-103.

Spearman M, Dionne B, Butler B. 2011. Chapter 12: The Role of Glycosylation in Therapeutic Antibodies. *Antibody Expression and Production*: Springer.

Sunley K, Tharmalingam T, Butler M. 2008. CHO cells adapted to hypothermic growth produce high yields of recombinant beta-interferon. *Biotechnol Prog* 24(4):898-906.

Tom R, Bisson L, Durocher Y. 2008. Purification of His-Tagged Proteins Using Fractogel-Cobalt. *Cold Spring Harbor Protocols* 2008(3):pdb.prot4980.

Umana P, Jean-Mairet J, Moudry R, Amstutz H, Bailey JE. 1999. Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* 17(2):176-80.

Viens A, Harper F, Pichard E, Comisso M, Pierron G, Ogryzko V. 2008. Use of protein biotinylation in vivo for immunoelectron microscopic localization of a specific protein isoform. *J. Histochem. Cytochem.* 56(10):911-9.

Walker MR, Lund J, Thompson KM, Jefferis R. 1989. Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors. *Biochem J* 259(2):347-53.

Zeck A, Pohlentz G, Schlothauer T, Peter-Katalinic J, Regula JT. 2011. Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcgammaRIIIa. *J Proteome Res* 10(7):3031-9.

## **Chapitre 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES AU CHAPITRE PRÉCÉDENT : APPLICATION DE LA MÉTHODOLOGIE DÉVELOPPÉE**

Ce chapitre présente les résultats obtenus par l'application de la méthodologie SPR développée dans le deuxième article (Chapitre 5). Ces résultats ont été générés grâce à une collaboration au sein du réseau MabNet avec une étudiante au doctorat en biochimie de l'Université de Montréal, Céline Raymond. Cette dernière a produit des anticorps (TZM) ayant différents profils de glycosylation dans le cadre de sa thèse. Ces anticorps ont été analysés par SPR (Figure 6-1) et comparés dans un essai cellulaire d'ADCC (Figure 6-2) avec le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub>. Ces données font partie d'un ensemble de résultats qui seront soumis pour publication dans les prochaines semaines.

Les anticorps produits en cellules de mammifère CHO sont essentiellement fucosylés et sont caractérisés par l'absence ou la présence d'un seul résidu galactose (G0F ou G1F). Ainsi, pour produire différents variants de la glycosylation en cellules CHO, plusieurs plasmides codant pour des enzymes de la glycosylation ont été co-transfectés (Raymond et al., 2015): la  $\beta$ 1,4-galactosyltransférase I (GT), la  $\alpha$ 2,6-sialyltransférase I (ST6) et l'oxydoréductase GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose réductase (RMD). Cette dernière enzyme convertit le précurseur de la glycosylation GDP-fucose en GDP-rhamnose, ce qui empêche l'addition du fucose à la chaîne de glycans. TZM a soit été exprimé seul (TZM), ou co-exprimé avec GT (TZM GT), RMD (TZM RMD), GT et RMD (TZM GTRMD), GT et ST6 (TZM GTST6) et GT, ST6 et RMD (TZM GTST6RMD). Deux lots de TZM GTST6RMD ont été produits : une récolte 4 jours post-transfection (A) et 5 jours post-transfection (B). Les anticorps ont tous été purifiés par chromatographie d'affinité. Le dernier variant a été obtenu en effectuant une sialylation *in vitro* du TZM GTST6, c'est-à-dire en présence de CMP-sia et l'enzyme humaine soluble ST6 (TZM GTST6 SIV).

Pour l'analyse qualitative par SPR, tous les anticorps ont été injectés à une concentration de 300 nM pendant 2 minutes, suivi d'une période de dissociation d'environ 4 minutes 30 secondes. Les sensogrammes ont été normalisés à la fin de l'injection de l'analyte (2 minutes) afin de comparer les résultats. Chacun des échantillons a été injecté à quatre reprises et tous les réplicas étaient superposés. De prime abord, on constate que l'association et la dissociation des différents TzM au récepteur FcγRIIIa varient dépendamment du profil de glycosylation de l'anticorps. TzM et TzM GT présentent le profil attendu, tel que présenté dans l'article 2 (Chapitre 5). Une différence est notable entre le groupe fucosylé et afucosylé. On note que les anticorps ne présentant pas de résidu fucose sur leur chaîne de glycan s'associent plus rapidement et se dissocient plus lentement au récepteur, contrairement aux TzM fucosylés. Dans chacun de ses deux groupes (fucosylé vs. afucosylé), on constate la même tendance : plus la chaîne de sucre est longue, plus l'association et la dissociation se fait lentement.

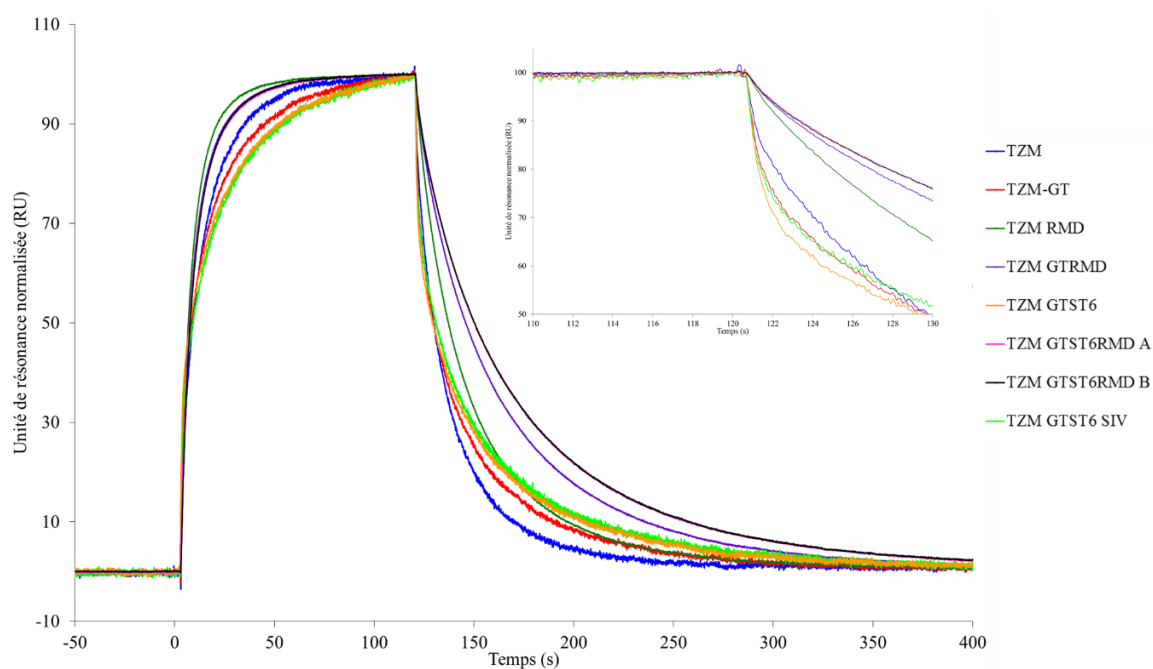


Figure 6-1: Sensogrammes normalisés présentant l'association de 8 IgGs ayant différents patrons de glycosylation avec le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub>

L'essai ADCC de substitution a été effectué avec des cellules effectrices exprimant le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub>. L'initiation de la réponse ADCC par la liaison de l'anticorps avec le récepteur se



traduit par un signal luminescent proportionnel à la réponse ADCC. Les anticorps ont d'abord été mis en contact avec les cellules cibles qui expriment l'antigène de TzM, soit HER2. Par la suite, les complexes immuns ont été mélangés avec les cellules effectrices durant six heures avant de quantifier le signal luminescent. L'anticorps Synagis a servi de contrôle négatif à l'expérience. Selon les résultats obtenus (Figure 6-2), on constate qu'il y a deux populations : TzM fucosylé et afucosylé. Parmi ce dernier groupe, on constate que l'anticorps galactosylé et celui qui est sialylé (A et B) présentent une meilleure réponse ADCC que le TzM « modèle ». Plus la chaîne de glycane est longue, plus on obtient une meilleure réponse ADCC avec FcγRIIIa<sub>F158</sub>. Une autre expérience ADCC a été effectuée avec le groupe fucosylé afin de mieux différencier les réponses et la même tendance a été observée (résultats non présentés).

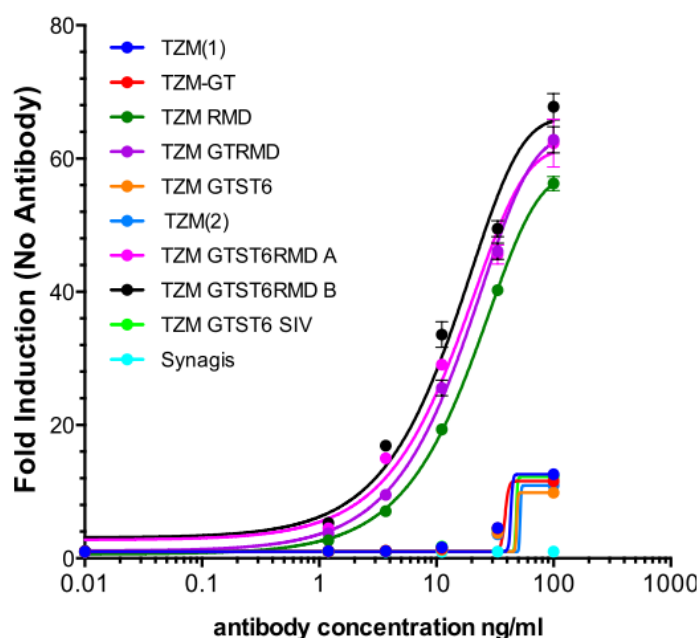


Figure 6-2 : Résultats d'ADCC avec le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub> et 8 IgGs présentant différents patrons de glycosylation

Les résultats SPR et ADCC démontrent les effets du fucose et de la longueur de la chaîne de glycanes sur l'anticorps TzM. L'effet du fucose est en accord avec la littérature (Ferrara et al., 2011; Houde et al., 2010; Scallon et al., 2007a). L'impact de la glycosylation et la sialylation des anticorps a été moins étudié et présente quelques résultats contradictoires (Houde et al., 2010; Kaneko et al., 2006; Yu et al., 2013). Il est toutefois difficile de comparer les résultats de la

littérature puisque les techniques et molécules utilisées varient. Pour la première fois, une méthodologie SPR a été appliquée à plusieurs anticorps ayant différents patrons de glycosylation afin de les différencier et les résultats obtenus ont été validés par essai cellulaire.

## **Chapitre 7 ARTICLE 3 : QUANTIFICATION ET ÉVALUATION SIMULTANÉE DE LA BIOACTIVITÉ DE L'ANTICORPS PRODUIT PAR LES CELLULES CHO – L'UTILISATION DE L'ECTODOMAINE DE Fc $\gamma$ RI ET LE BIOCAPTEUR SPR**

### **7.1 Présentation de l'article**

Cette section reprend l'article intitulé « **Quantification and simultaneous evaluation of the bioactivity of antibody produced in CHO cell culture - The use of the ectodomain of Fc $\gamma$ RI and surface plasmon resonance-based biosensor** ». Il a été soumis pour publication dans la revue *Journal of Immunological Methods* en janvier 2016.

Un essai utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR) a été développé dans le but de quantifier l'anticorps monoclonal Trastuzumab (TZM) à partir du surnageant d'une culture de cellules de mammifère en utilisant l'ectodomaine du récepteur Fc $\gamma$ RI (CD64) et afin de vérifier la bioactivité du AcM (association à son antigène HER2) en une seule expérience. Sous la condition de limitation par transfert de masse, il a été possible de quantifier l'anticorps présent dans des échantillons de culture cellulaire non purifiés. Les résultats obtenus sont en accord avec la quantification par HPLC-Protéine A. La capture de l'anticorps confirme la capacité de la portion Fc à s'associer au récepteur Fc $\gamma$ RI présent à la surface de la SPR ainsi que la portion Fab à s'associer à l'antigène, HER2. Les cinétiques mesurées 48h après la transfection des cellules jusqu'à la fin de la culture sont superposables, ce qui laisse supposer que la qualité des anticorps demeure la même tout au long de la culture. Cette approche SPR est d'un grand intérêt pour un suivi *at-line* d'une culture à des fins de contrôle qualité et pour le développement d'un procédé de production d'anticorps.

## **7.2 Quantification and simultaneous evaluation of the bioactivity of antibody produced in CHO cell culture - The use of the ectodomain of FcγRI and surface plasmon resonance-based biosensor**

Running title: SPR Assay to monitor Mab production and bioactivity

July Dorion-Thibaudeau<sup>1,2</sup>, Yves Durocher<sup>2,3\*</sup>, Gregory De Crescenzo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, P.O. Box 6079, succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3A7. <sup>2</sup>Life Sciences, NRC Human Health Therapeutics Portfolio, Building Montreal-Royalmount, National Research Council Canada, Montreal, QC, Canada, H4P 2R2 <sup>3</sup>Biochemical Department, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada, H3C 3J7

\* Both authors equally contributed to this work. To whom correspondence should be addressed

Email: [gregory.decrescenzo@polymtl.ca](mailto:gregory.decrescenzo@polymtl.ca) , Tel.: +1 514 340-4711x7428, Fax: +1 514 340-2990;

Email: [yves.durocher@nrc-cnrc.gc.ca](mailto:yves.durocher@nrc-cnrc.gc.ca) , Tel.: +1 514 496-6192, Fax: +1 514 496-6785

Submitted for publication in Journal of Immunological Methods

### 7.2.1 Abstract

A surface plasmon resonance (SPR)-based assay has been developed in order to quantify the monoclonal antibody (Mab) Trastuzumab within the supernatant of a mammalian cell culture using the ectodomain of Fc $\gamma$ RI (CD64) and confirm Mab bioactivity, i.e. binding to its antigen HER2, in a single biosensing experiment. Under partial mass transport limitation, we were able to quantify Mab present in unpurified samples taken throughout the cell culture. While Mab capture on the biosensor surface confirmed the ability of its Fc region to bind to Fc $\gamma$ RI, the binding activity of its Fab region was also tested by injecting increasing concentrations of the Mab HER2. The kinetics of interactions we recorded from 48 hours post transfection (hpt) until the end of the culture, were superimposable, which highly suggested that the quality attributes of the antibody were conserved throughout the process. This SPR methodology is thus of great interest for at-line quality control analysis during Mab production campaign.

Keywords: Fc $\gamma$ R; Monoclonal Antibody; Surface Plasmon Resonance (SPR); monitoring

## 7.2.2 Introduction

In the past years, monoclonal antibodies (Mabs), especially IgGs, had significant success in both regulatory approval and global sales for many types of treatments against cancer as well as autoimmune, inflammatory and infectious diseases (del Val et al., 2010). These IgGs are divided in different subclasses depending on their structures (IgG1-4) (Hayes et al., 2014). Each IgG has a Y-shaped structure composed of two light chains and two heavy chains containing a Fab region that associates with the antigen and a Fc region that associates with specific receptor present on the surface of immune cells (FcγR) (Jefferis, 2012). Many expression systems exist for producing recombinant protein at large-scale such as insect, microbial, yeast and plants but mammalian cells are the most widely used host for commercial production. Indeed, 70 % of all recombinant therapeutic proteins are produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells (Kim et al., 2012). During process research and development (R&D) of a new therapeutic Mab, it is essential to monitor the cell culture in order to optimize protein production and evaluate product quality. While optimizing protein yield by modifying culture parameters, product integrity and activity may be affected. In the past years, surface plasmon resonance (SPR) biosensing has been shown to be a powerful tool to quantify protein production and monitor protein activity of unpurified samples (Chavane et al., 2008; Pol et al., 2007). In this study, we have developed a methodology using a SPR biosensor to quantify Trastuzumab (TzM, an IgG1) production in a CHO cell culture supernatant and to evaluate its bioactivity using both the high affinity FcγR (FcγRI, CD64) and its antigen (HER2), respectively, in one single cycle of injections.

## 7.2.3 Results and discussion

### 7.2.3.1 Off-line quantification of TzM using FcγRI, FcγRII and FcγRIIIa

Trastuzumab producing CHO cells were transfected and cultured as described elsewhere (Dorion-Thibaudeau et al., 2015). Culture sampling was performed every 12h, starting from 24h post transfection (hpt), until cell viability was approximately 60 %. Each supernatant was centrifuged and filtered prior injection on the SPR instrument surfaces (Biacore™ T100). Purified biotinylated FcγRs were captured onto the biosensor surfaces via biotin/streptavidin interactions, using the Biacore Biotin CAPture kit for all analyses (Dorion-Thibaudeau et al., 2016). High receptor densities were combined to a low analyte injection flow rate (5 μL/min) to favour mass

transport limitation (MTL) (Richalet-Sécordel et al., 1997); in these conditions, partial MTL was achieved.

For biotinylated low affinity receptors (Fc $\gamma$ RIIIa, Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIb), non-specific binding was observed when injecting the diluted supernatants (Figure 1A, B and C) as molecular species present in the conditioned F17TM cell culture medium interacted with those surfaces (confirmed by injecting diluted fresh cell culture medium - data not shown). In stark contrast, sensorgrams collected with captured Fc $\gamma$ RI when injecting diluted supernatants (Figure 1D) were comparable to those recorded when injecting purified TZM (Dorion-Thibaudau et al., 2016). Therefore, only biotinylated Fc $\gamma$ RI was selected as an appropriate receptor for TZM quantification of unpurified samples by SPR.

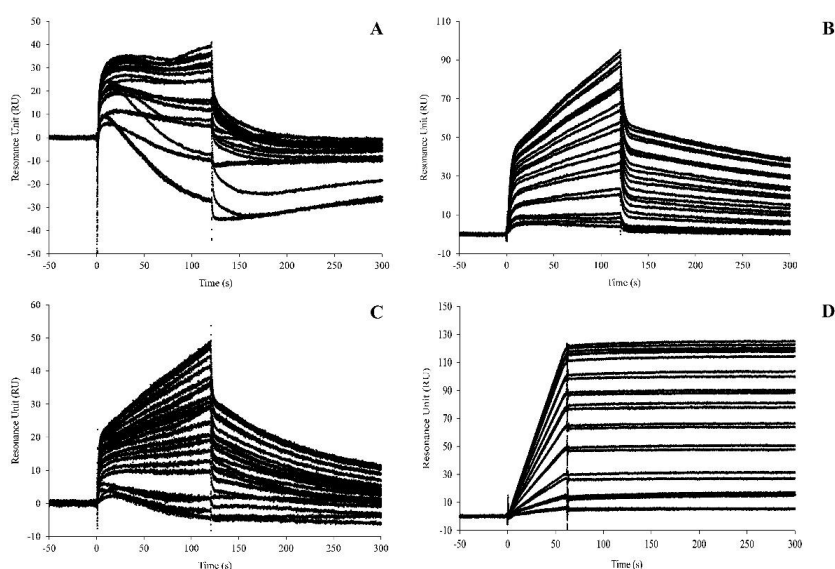


Figure 7-1: Control-corrected sensorgrams corresponding to duplicate injections of CHO cell culture supernatants (dilution 1/50 in HBS-P 1 $\times$ ) over 1 600 RU of biotinylated Fc $\gamma$ RIIIa (A), 2 000 RU of biotinylated Fc $\gamma$ RIIa (B), 2 000 RU of biotinylated Fc $\gamma$ RIIb (C) and 1 400 RU of biotinylated Fc $\gamma$ RI (D) that had been captured at the biosensor surface using the Biotin CAPture kit as described in (Dorion-Thibaudau et al., 2016). Supernatants were collected from 24 hpt to 144 hpt (every 12h), centrifuged (10 000  $\times$  g, 5 min) and filtered (0.2 $\mu$ m), prior injection on the biosensor surfaces.

### 7.2.3.2 Assay development using Fc $\gamma$ RI

A standard calibration curve (Figure 2A) was first generated by injecting dilutions of a purified TZM standard (total concentration was determined by absorbance readout at 280 nm while active concentration of the stock solution was determined by performing a calibration-free concentration analysis (CFCA) on the Biacore instrument with biotinylated Fc $\gamma$ RI as analyte. The active/total TZM ratio was 60 % for the TZM standard - data not shown). Linear regression between 15 and 55s of the Mab injection over captured Fc $\gamma$ RI was performed in order to determine the antibody initial binding rate for total antibody concentrations ranging between 0.2 and 25 nM (n=4). Concentrations of Mab present in unpurified supernatants were then assessed. Figure 2B shows a typical experiment for quantification and simultaneous bioactivity evaluation. First, supernatants were injected at 5  $\mu$ L/min for quantification (1), each Mab injection was followed by a running buffer injection to reach a stable capture of the antibody onto the receptor (2). Afterwards, increasing concentrations of the Mab antigen, HER2, were injected at 50  $\mu$ L/min at concentrations of 1 nM (3), 5 nM (4), 10 nM (5) and 30 nM (6). For quantification (Figure 2B - 1), linear regression was performed between 15 and 55s for each supernatant (n=4) to derive the initial reaction rate and therefore determine the active antibody concentration.

To validate our quantification methodology, we also determined TZM concentration within the same supernatants by two other approaches. The first one corresponded to CFCA for each supernatant using a SPR surface on which Fc $\gamma$ RI had been captured via biotin/streptavidin interactions (as for the calibration curve) (Richalet-Sécordel et al., 1997). The second approach relied on quantitative HPLC using a Protein A column calibrated with injections of TZM standards (all samples were filtered prior injection to the column and were eluted with 0.15M NaCl, pH 2.0; absorbance was taken at 280 nm (n=3)).

The antibody concentrations derived from both SPR analyses (calibration curve and CFCA) and HPLC-Protein A analyses are shown in Figure 2C. Very similar results were obtained for each time-point with the three approaches. Indeed, although protein A and Fc $\gamma$ RI do not bind to the exact same region of the Fc portion, we observed only a 3 % deviation between the HPLC approach and the SPR approach relying on a standard curve (correlation coefficient > 0.99 - data not shown). This confirmed that our methodology for quantification using Fc $\gamma$ RI (rather than Protein A) is a



valid approach. As shown in Figure 2D, TZM concentrations determined with both SPR approaches, differed only by 2 % despite non-optimal conditions for CFCA measurements (since we determined QC ratios close to 0.3 for several TZM injections).

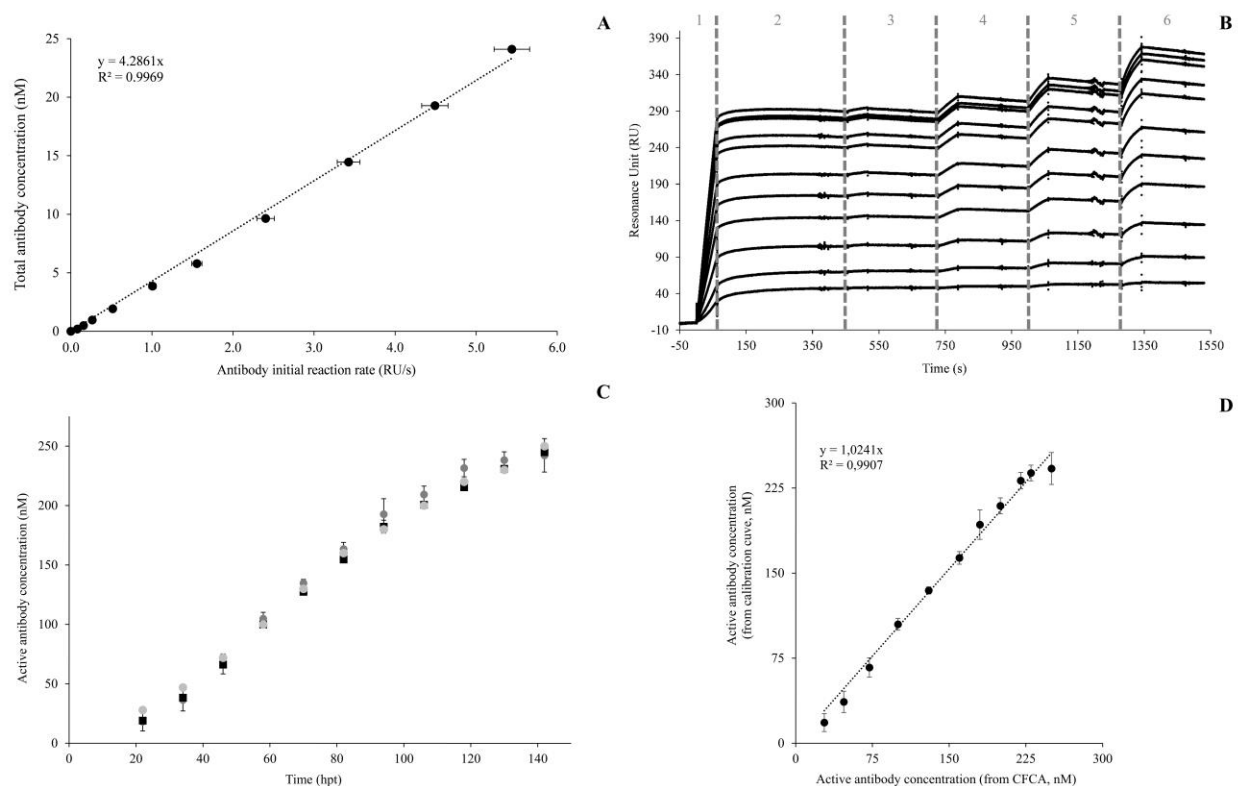


Figure 7-2: Off-line monitoring by SPR of a CHO cell culture to quantify TZM production and confirm TZM bioactivity. (A) Calibration curve generated by extracting the initial reaction rate of control-corrected sensorgrams corresponding to purified Mab injections on captured FcγRI (dilution 1/20, n=4). (B) Sensorgrams corresponding to the injection of each cell culture supernatant (1), buffer injection (2) and then injections of increasing concentrations of TZM antigen at 50 μL/min, HER2 (eBioscience, USA), at 1 nM (3), 5 nM (4), 10 nM (5) and 30 nM (6). (C) Off-line quantification of active TZM within cell culture supernatants by SPR using the calibration curve shown in A (black square, n=4), by HPLC with a protein-A column (dark gray circle, n=3, POROS® A20 column, Invitrogen, NY, Part# 2-1001-00) or by SPR using the CFCA method (light gray circles, n=3). (D) Correlation between active TZM concentrations determined by SPR with the calibration method vs. CFCA method.

To further confirm the integrity and activity of the Fab regions of TZM, the signals resulting from the injections of increasing concentrations of HER2 for each time point were also processed (Figure 2B steps 3-6). By normalizing each of these series of sensorgrams corresponding to HER2

injections, we observed that the resulting sensorgrams were superimposable from 48 hpt until the end of the culture (Figure 3). This implies that the kinetics of interaction between TZM and HER2 did not change over this time period, in turn highly suggesting that the Mab bioactivity (i.e., the ability of Trastuzumab to bind to HER2) was not altered. The processing of the sensorgrams corresponding to the first two samples (24 and 36 hpt, shown in light gray in Figure 3) gave curves that are not superimposed with those of the other samples, more likely due to an unfavourable signal-to-noise ratio during data normalization (too low Mab concentration in the supernatant). This limitation could be resolved by performing a longer injection of the Mab-containing supernatants corresponding to the early cell culture sampling points (in order to accumulate more Mab material on the surface prior HER2 injections).

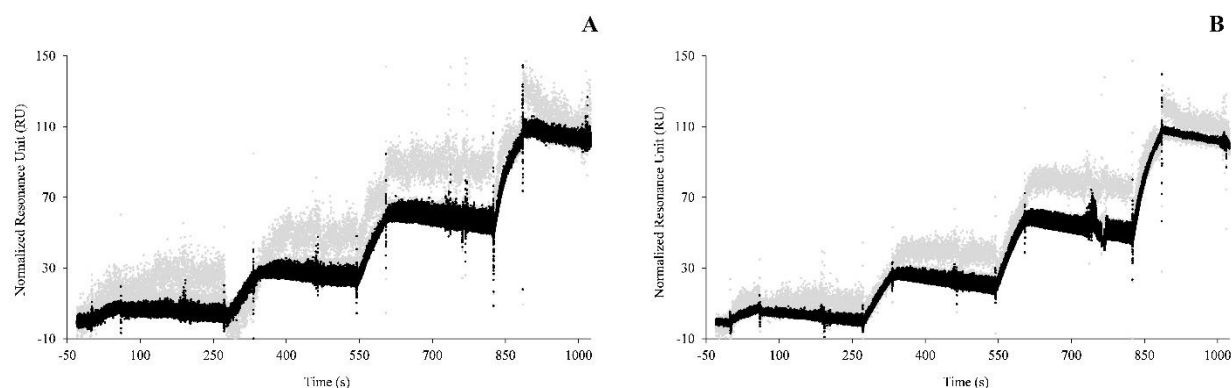


Figure 7-3: Normalized sensorgrams corresponding to the interactions between HER2 and surface-captured TZM. Increasing concentrations of HER2 were injected (1, 5, 10, 30 nM, 1 min at 50  $\mu$ L/min.) over captured TZM (resulting from supernatant injections at 1/50 (A) and 1/20 (B) dilutions in HBS-P buffer, followed by a 3-min buffer injection to stabilize TZM capture). All responses were normalized at the end of the buffer injection following the last HER2 injection. Supernatants corresponding to 24 and 36 hpt are shown in light gray while those corresponding to 48 up to 144 hpt are shown in black.

### **7.2.4 Conclusion**

A method for the quantification of Mabs within cell culture medium, relying on captured FcγRI at the surface of an SPR-based biosensor has been developed. The method was shown to give similar results to those of a quantification assay based on the use of HPLC with a protein A column or by SPR, using the CFCA method. Moreover, within the same SPR experiment, for every cell culture supernatant, we were able to confirm the integrity of the Mab Fc and Fab regions, i.e., Mab binding to FcγRI and HER2, within the same analysis cycle. We believe this methodology is of great interest for the at-line monitoring of Mab critical quality attributes for routine quality control in an established process or while developing biosimilars.

### **7.2.5 Acknowledgments**

The authors would like to thank Louis Bisson for his help with cell culture and for performing HPLC analysis. This work was supported by the NSERC Strategic Network for The Production of Single-type Glycoform Monoclonal Antibodies (MabNet) group.

## 7.2.6 References

- Chavane, N., Jacquemart, R., Hoemann, C.D., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., (2008) At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Anal Biochem* 378, 158-165.
- del Val, I.J., Kontoravdi, C., Nagy, J.M., (2010) Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns. *Biotechnol Prog* 26, 1505-1527.
- Dorion-Thibaudeau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., Durocher, Y., (2015) Biotinylation of the Fc $\gamma$  receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *Journal of Molecular Recognition*.
- Hayes, J.M., Cosgrave, E., F. J., Struwe, W., B., Wormald, M., Davey, G., P., Jefferis, R., Rudd, P.M., (2014) Glycosylation and Fc Receptors. In: Daëron, M., Nimmerjahn, F. (Eds.). Springer International Publishing, Fc Receptors, pp. 165-199.
- Jefferis, R., (2012) Isotype and glycoform selection for antibody therapeutics. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526, 159-166.
- Kim, J., Kim, Y.-G., Lee, G., (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 917-930.
- Pol, E., Karlsson, R., Roos, H., Jansson, Å., Xu, B., Larsson, A., Jarhede, T., Franklin, G., Fuentes, A., Persson, S., (2007) Biosensor-based characterization of serum antibodies during development of an anti-IgE immunotherapeutic against allergy and asthma. *Journal of Molecular Recognition* 20, 22-31.
- Richalet-Sécordel, P.M., Rauffer-Bruyère, N., Christensen, L.L.H., Ofenloch-Haehnle, B., Seidel, C., Van Regenmortel, M.H.V., (1997) Concentration Measurement of Unpurified Proteins Using Biosensor Technology under Conditions of Partial Mass Transport Limitation. *Anal Biochem* 249, 165-173.

## Chapitre 8 DISCUSSION GÉNÉRALE

Avec plusieurs brevets qui arriveront à échéance dans les prochaines années, un nombre grandissant de compagnies biopharmaceutiques a démarré des programmes de développement de biosimilaires. Ces nouvelles molécules thérapeutiques doivent répondre à plusieurs critères des agences de santé. Un facteur important à contrôler pour répondre à ces lignes directrices est l'état de glycosylation de la protéine. En effet, la microhétérogénéité de la glycosylation peut avoir des répercussions sur l'innocuité du produit. Ainsi, ces dernières années, plusieurs études se sont penchées sur les mécanismes cellulaires de la glycosylation afin de mieux comprendre ce processus et de mieux le contrôler. C'est dans ce contexte qu'est né le réseau pancanadien MabNet auquel ce projet est rattaché. Le réseau a pour but de rassembler des chercheurs de haut niveau, spécialisés dans différents domaines afin de produire, purifier et analyser des anticorps ayant un profil de glycosylation enrichi ou uniforme. Cette thèse de doctorat s'inscrit dans la section analytique du réseau et a pour objectif de développer un essai cinétique et/ou thermodynamique fiable afin d'évaluer le patron de glycosylation de différents lots d'anticorps monoclonaux. Pour se faire, les interactions entre les domaines extracellulaires des récepteurs Fc $\gamma$  et les anticorps monoclonaux ont été caractérisées en utilisant un biocapteur de type SPR.

Les études SPR s'intéressant aux interactions entre anticorps et récepteurs emploient différentes méthodologies d'immobilisation par exemple, le couplage par les amines ou encore la capture non covalente d'un des deux partenaires. Le couplage par les amines directement à la surface de dextran carboxyméthylé conduit très souvent à l'obtention d'une population hétérogène à la surface du biocapteur. Pour obtenir une population homogène à la surface, il est possible d'utiliser une chimie plus spécifique (par exemple basée sur les thiols présents uniquement sur les chaînes des résidus cystéines) mais plus contraignante (dans le cas d'une chimie basée sur les thiols, un résidu cystéine est rajouté sur la protéine par génie génétique - (De Crescenzo et al., 2003)). Une alternative intéressante à l'immobilisation covalente est l'utilisation d'un agent de capture qui, lorsqu'il est couplé de façon covalente à la surface du biocapteur, peut interagir avec le ligand à capturer. Ainsi, chaque cycle d'analyse requiert de capturer le ligand puis d'enregistrer son interaction avec l'analyte injecté par la suite. Cette méthodologie nécessite plus de matériel, puisqu'à chaque cycle, il est nécessaire de capturer à nouveau le ligand. De plus, il est essentiel d'avoir une interaction stable

entre l'agent de capture et le ligand, sans quoi les cinétiques mesurées seront biaisées. Parmi les travaux répertoriés dans la littérature, certains groupes de recherche immobilisent les récepteurs Fc à la surface du biocapteur alors que d'autres utilisent l'anticorps comme ligand. Ces protocoles ont possiblement conduit à des différences au niveau des valeurs cinétiques et thermodynamiques rapportées. Plusieurs modèles de cristallographie ont démontré que l'interaction entre les FcγRs et les IgG avait une stœchiométrie de 1 :1. Il est donc attendu que peu importe quelle molécule du couple récepteur-anticorps était immobilisée, les cinétiques obtenues devraient être les mêmes. Les différences rapportées dans la littérature laissent entrevoir que les méthodologies employées n'étaient pas toutes adéquates pour une caractérisation fine des interactions. De ce fait, il nous est apparu nécessaire de développer une méthode d'analyse fiable afin d'obtenir des résultats clairs quant à l'impact de la glycosylation des AcMs sur leurs interactions avec les récepteur Fcγ.

## 8.1 Développement de la méthode SPR

Dans une première étude, les récepteurs FcγRI et FcγRIIIa<sub>F158</sub> ont été produits en cellules de mammifère, purifiés grâce à leur étiquette histidine et l'absence d'agrégat a été vérifiée. Pour l'optimisation de l'essai SPR, plusieurs facteurs ont été pris en compte comme le débit utilisé et la densité de ligand à la surface afin de limiter les artéfacts causés par la limitation par transfert de masse. L'orientation du récepteur était au cœur de cette étude afin de déterminer si elle avait un impact majeur sur la qualité des cinétiques obtenues. La comparaison entre l'immobilisation covalente par les amines et par la capture orientée du récepteur grâce à un anticorps anti-histidine couplé à la surface a été effectuée dans un premier temps. Pour le récepteur de faible affinité, FcγRIIIa, les résultats ont démontré sans ambiguïté que le greffage covalent par les amines (non orienté) peut être corrélé à des cinétiques plus complexes, possiblement dues à la présence de plusieurs populations à la surface du biocapteur. Les constantes thermodynamiques apparentes ( $K_D$ ) obtenues sont cependant en accord avec les valeurs de la littérature pour les approches d'immobilisation orientée et non orientée. En effet, il a été observé qu'un greffage non orienté est associé un  $K_D$  plus élevé comparativement à une approche orientée (Tableau 2-2). Malgré l'amélioration de l'essai en utilisant une approche orientée (grâce à un anticorps anti-histidine), les cinétiques enregistrées n'étaient toujours pas décrites adéquatement par un modèle de Langmuir. En effet, une perte de matériel en fin d'injection de T2M sur une surface de FcγRIIIa était visible. Ce comportement atypique pouvait avoir différentes causes. Premièrement, il est possible que le

TZM (analyte) ait une affinité pour l'anticorps anti-histidine (agent de capture). Deuxièmement, la diminution peut être causée par la présence de différentes populations de TZM (différents profils de glycosylation) s'associant à FcγRIIIa: celles ayant une masse plus élevée (à cause de leur profil de glycosylation) se dissociant plus rapidement que celles ayant une plus petite masse. Puisque le TZM NG (non glycosylé) ne s'associe pas au récepteur et que cette diminution dans le signal est aussi observée, nous avons penché pour la première hypothèse. Il est important de rappeler que d'autres chercheurs ont obtenu le même type de données expérimentales en utilisant une méthodologie similaire, sans toutefois soulever la problématique (Hayes et al., 2014; Luo et al., 2009; Zeck et al., 2011). L'expérience utilisant FcγRI non orienté par le couplage des amines, n'a pas été un succès puisque toutes les solutions de régénération de la surface ont affecté la bioactivité du récepteur d'un cycle à l'autre. La capture du récepteur par l'anticorps anti-histidine n'a pas été un succès non plus, puisqu'à grande concentration de AcM injecté ( $\geq 100$  nM), la réponse nette devient négative après 10 minutes de dissociation. L'hypothèse posée est que l'association du TZM avec le récepteur diminue l'affinité entre ce dernier et l'agent de capture. Cette diminution de l'interaction peut être causée par un changement de conformation du complexe FcγRI-AcM qui influence l'interaction étiquette histidine-anticorps anti-his. Ainsi, le récepteur se dissocie partiellement de l'agent de capture. Ces résultats démontrent que la capture via un anticorps anti-his n'est pas idéale et qu'un autre agent de capture devrait être envisagé afin d'éliminer ces artéfacts. Cette étude initiale nous a aussi permis de mettre en évidence l'intérêt d'un test SPR pour détecter la présence d'agrégats dans les lots d'anticorps purifiés, une excellente alternative à une analyse par ultracentrifugation analytique.

Dans une deuxième étude, l'approche utilisant la forte affinité entre la biotine et la streptavidine pour capturer les récepteurs à la surface de la SPR a été mise à profit. Pour ce faire, nous avons développé un nouveau protocole de biotinylation des récepteurs Fcγ. La méthodologie que nous avons mise en place repose sur la co-transfection des cellules de mammifère avec deux plasmides codant pour l'enzyme BirA (responsable de la biotinylation) et le récepteur ayant une séquence peptidique BAP (qui sera biotinylée) en C-terminal. Quelques études ont rapporté la production de protéine biotinylées en employant un seul vecteur codant pour la protéine et l'enzyme BirA. Comparativement à ces techniques, notre approche expérimentale de biotinylation *in-cell* par co-transfection permet d'ajuster les ratios enzyme-substrat afin d'optimiser les rendements finaux.



FcγRIIIa<sub>F158</sub> a été produit par biotinylation *in-cell* et par biotinylation *in vitro* (réaction enzymatique après purification). Les niveaux de biotinylation des deux techniques étaient similaires, mais le rendement était meilleur avec l'approche *in-cell*. Rien d'étonnant puisque cette méthode requiert moins d'étapes de purification. Ces deux lots de récepteurs biotinylés ont été ensuite comparés par SPR et AUC afin de démontrer qu'ils étaient similaires. Les résultats obtenus par la distribution des coefficients de sédimentation indiquent que la conformation du récepteur n'est pas influencée par la méthode. Cette hypothèse est aussi validée par les sensogrammes obtenus lorsque le récepteur s'associe avec le TzM.

Les quatre récepteurs ainsi biotinylés (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb et FcγRIIIa<sub>F158</sub>) ont été produits et utilisés pour développer améliorer l'approche analytique SPR précédente. Notre nouvelle stratégie repose sur la grande affinité entre l'agent de capture (streptavidine) et le récepteur biotinylé, qui permet une capture stable et orientée du ligand. Contrairement aux résultats obtenus avec les récepteurs de faible affinité combinés avec la technologie anti-histidine, aucune diminution de signal en fin d'injection d'anticorps n'a été observée. Cette diminution était donc artéfactuelle. Cependant, les données enregistrées quant aux interactions anticorps-récepteurs dévient encore d'un modèle cinétique simple. L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette déviation est l'hétérogénéité de la population de TzM (confirmée par une analyse des profils de glycosylation par spectrométrie de masse): chacune des sous-populations de TzM s'associe et se dissocie du récepteur avec des constantes cinétiques différentes. Cette hypothèse est d'autant plus probable au vu des résultats cinétiques obtenus en analysant les différents lots de TzM enrichis en glycoformes distincts (Chapitre 6).

Finalement, cette méthodologie de capture des récepteurs a aussi amélioré la qualité des sensogrammes obtenus avec le récepteur de haute affinité, FcγRI. En effet, la réponse négative observée lors de la phase de dissociation avec la capture précédente (anti-his) n'est plus présente et il a été possible d'évaluer les constantes cinétiques et la constante thermodynamique de dissociation des complexes.

Malgré la déviation entre les données expérimentales et un modèle simple d'interaction 1 :1, cette approche a permis d'évaluer semi quantitativement les profils de glycosylation des AcMs lorsqu'ils étaient en contact avec les récepteurs FcγRI et FcγRIIIa.

## 8.2 Application de la méthodologie développée

Dans une troisième étude, en collaboration avec Céline Raymond (étudiante à l'Université de Montréal, membre du MabNet), la stratégie de capture biotine-streptavidine a été employée afin d'évaluer les différents patrons de glycosylation du TzM. Huit TzM ayant des patrons de glycosylation différents ont été analysés par notre approche SPR et il a été possible de noter des différences dans leurs profils d'association et de dissociation avec FcγRIIIa en fonction de leur niveau de fucosylation. Par ailleurs, la même tendance se retrouve dans les deux groupes (fucosylés vs. afucosylés) : plus la chaîne de sucres est longue, plus lentes sont l'association et la dissociation. Ces résultats ont aussi été confirmés par test cellulaire d'ADCC avec des cellules surexprimant le même récepteur. Ces résultats complémentaires, qui seront soumis pour publication sous peu, viennent confirmer la validité et l'intérêt de la méthodologie que nous avons développée pour caractériser les interactions FcγR-AcM et prédire leur comportement dans les tests d'ADCC.

Dans une quatrième étude, une analyse SPR utilisant la même approche (biotine-streptavidine) a été employée pour caractériser la production d'un anticorps (TzM) à même le surnageant. Afin de favoriser les conditions de limitation par transfert de masse (LTM), une grande densité de récepteur a été capturée à la surface et les surnageants ont été injectés à faible débit. L'utilisation des récepteurs de faible affinité pour cette étude n'a pas été possible puisque des molécules présentes dans le milieu de culture s'associaient aux récepteurs. Cependant, les sensogrammes obtenus avec FcγRI étaient similaires à ceux représentant l'interaction avec le TzM purifié, ce qui nous a permis de l'utiliser pour la quantification des échantillons non purifiés. Après avoir généré une courbe de calibration, il a été possible de quantifier le TzM présent dans le surnageant et ces valeurs sont en accord avec celles obtenues par HPLC quantitative et par analyse CFCA sur la SPR (*Calibration free concentration analysis*). Cette comparaison valide notre approche pour la quantification du TzM dans une solution non purifiée. Après l'injection du TzM, des concentrations croissantes de l'antigène (HER2) ont été injectées afin de confirmer l'intégrité et la bioactivité de la région Fab du TzM. En normalisant les sensogrammes, il a été possible de confirmer que les cinétiques d'interaction (et donc la bioactivité de la portion Fab) ne changeaient pas après 48h post-transfection puisque les sensogrammes correspondants étaient tous superposables. Cette étude est d'un intérêt majeur car elle suggère que cette approche peut être mise en place pour assurer le suivi

« en ligne » ou « hors ligne » de la qualité des anticorps produits dans un procédé établi ou encore pour le développement d'un biosimilaire.

Malgré le succès de l'application de la méthodologie SPR au suivi d'une culture, d'un point de vue fondamental, une incertitude quant à l'imperfection du modèle de Langmuir pour décrire les cinétiques d'interaction entre anticorps et récepteurs subsiste. Comme discuté précédemment, la cause la plus probable réside dans l'hétérogénéité des populations d'anticorps injectés. Cependant, il nous faut garder à l'esprit qu'en plus des anticorps, les récepteurs présentent aussi différents profils de glycosylation dont nous n'avons pas tenu compte. Quelques articles rapportent un effet de la glycosylation du récepteur FcγRIIIa sur l'interaction avec les IgGs. Il a été démontré que l'élimination de la glycosylation au site Asn<sub>162</sub> du récepteur déstabilise l'interaction avec le AcM et que la glycosylation au site Asn<sub>45</sub> a aussi un impact négatif sur l'association avec l'anticorps (Ferrara et al., 2006b; Shibata-Koyama et al., 2009). Une étude publiée plus récemment a aussi démontré qu'il existe une interaction entre les glycans du récepteur et de l'IgG (Ferrara et al., 2011). Hayes a démontré que l'utilisation de FcγRI aglycosylé réduit le niveau d'anticorps pouvant s'y associer comparativement à un récepteur glycosylé, sans toutefois influencer la dissociation du complexe ( $k_d$ ) (Hayes et al., 2014). Ces résultats démontrent l'influence positive et négative de la glycosylation influençant l'association FcγR-IgG et par le fait même, les fonctions effectrices du système immunitaire.

## Chapitre 9 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse de doctorat peuvent être divisés en deux sections. La première étant le développement d'un essai fiable par détection de résonance des plasmons de surface afin de caractériser les interactions entre les récepteurs Fc $\gamma$  et les AcMs. La deuxième étant l'application directe de la méthodologie développée afin de prédire le potentiel thérapeutique des AcMs purifiés ou en cours de production.

La première section comprend les deux premiers articles publiés qui consistent au développement de l'essai SPR. Dans un premier temps, les récepteurs (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIb et Fc $\gamma$ RIIIa) comprenant une étiquette histidine ont été produits en cellules de mammifère et purifiés (Chapitre 4). Une comparaison des techniques d'immobilisation fréquemment employées a été effectuée afin d'évaluer si la capture orientée du ligand améliorerait les cinétiques obtenues. Malgré une amélioration notable dans la qualité des sensogrammes générés, une déviation au modèle d'interaction 1 :1 était toujours présente. De plus, certains artefacts liés à la capture par un anticorps anti-histidine ont été remarqués, comme la pente descendante durant l'association des AcMs aux récepteurs de faible affinité et un profil de dissociation problématique pour le récepteur de haute affinité (i.e., atteignant des valeurs négatives). Des résultats complémentaires ont cependant démontré que la présence d'une faible population d'agrégats ( $\approx 2\%$ ) dans l'échantillon d'anticorps pouvait influencer les cinétiques obtenues (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). Ces différences peuvent être mises à profit afin de détecter la présence d'agrégats dans un contexte de contrôle de qualité. Par ailleurs, puisque la capture du récepteur par l'anticorps anti-histidine n'était pas stable, l'idée d'utiliser une interaction biotine-streptavidine a été émise (Chapitre 5) afin d'éliminer les artefacts liés à une capture sous-optimale. Les artefacts ont été éliminés grâce à cette nouvelle approche, améliorant ainsi les cinétiques. Cependant, les interactions anticorps-récepteur devaient toujours du modèle 1:1, laissant ainsi supposer que cette déviation provient de l'hétérogénéité causée par la glycosylation des protéines étudiées (Dorion-Thibaudeau et al., 2016).

La deuxième section comprend les résultats générés grâce à une collaboration au sein du réseau MabNet ainsi que le troisième article soumis pour publication et qui applique la méthodologie développée directement à des échantillons de surnageant de culture. Les résultats complémentaires (Chapitre 6) nous ont permis de valider la méthodologie SPR développée précédemment. Huit IgGs présentant différents patrons de glycosylation ont été analysées qualitativement par SPR et par essai cellulaire démontrant l'ADCC avec le récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub>. L'essai par biocapteur a permis de différencier tous les anticorps, démontrant ainsi l'effet de chacun des profils sur l'interaction avec FcγRIIIa<sub>F158</sub>. La fiabilité de la méthodologie a été confirmée en comparant les résultats obtenus aux résultats du test cellulaire. Par la suite, l'essai SPR a été utilisé afin de suivre la production d'un anticorps directement à partir du milieu de culture (Chapitre 7). Il n'a pas été possible d'employer les récepteurs de faible affinité pour cette étude puisque les anticorps produits font concurrence avec d'autres molécules présentes dans le milieu de culture. Cependant, FcγRI a pu être utilisé afin de quantifier les anticorps produits en cours de culture, vérifier la bioactivité pour la portion Fc et sa capacité à lier l'antigène en une seule expérience. L'évaluation de la glycosylation par le récepteur de haute affinité n'a cependant pas été concluante. Ainsi, le dernier objectif a été atteint en partie seulement, ce qui ouvre la voie à de nouvelles perspectives pour les futures recherches.

Dans la poursuite des travaux effectués selon les différents axes abordés dans ce doctorat, plusieurs voies nous semblent prometteuses :

#### Production des récepteurs Fcγ

Le récepteur de haute affinité FcγRI a été produit dans les cellules CHO, ce qui cause une différence au niveau du profil de glycosylation puisque les cellules ne sont pas d'origine humaine (Zeck et al., 2011). Un protocole permettant la production dans les cellules d'origine humaine (ex. HEK) représenterait mieux l'interaction FcγRI-AcM à la surface d'une cellule. Par ailleurs, les rendements de production sont faibles et les récepteurs sont majoritairement dimérisés, alors il serait intéressant de développer une lignée stable qui permet la biotinylation *in-cell* afin d'augmenter la quantité produite.

Puisqu'il a été démontré que le rendement de production des récepteurs biotinylés était inversement proportionnel à la quantité de plasmide BirA ajouté au mélange de transfection, un système inductible (ex. cumate) pourrait être envisagé si l'on désire produire ces protéines à plus grande

échelle. Le système inductible permet de contrôler la production d'une protéine d'intérêt qui serait possiblement toxique pour la cellule. Sans l'ajout de l'agent inducteur dans le milieu (ex. cumate), la protéine BirA ne serait pas produite.

### Amélioration de la méthodologie SPR

L'étude de l'impact de la glycosylation des quatre récepteurs Fcγ est une avenue intéressante afin d'améliorer la qualité des sensogrammes. Plusieurs études ont montré que le profil de glycosylation de FcγRIIIa avait un impact sur l'interaction avec les AcMs, mais peu d'études ont été menées pour les autres récepteurs (Hayes et al., 2014; Zeck et al., 2011). La glycosylation des récepteurs cause une population hétérogène au niveau du ligand ce qui peut être en partie la cause de la déviation au modèle 1:1.

De plus, la caractérisation des profils de glycosylation des AcMs, grâce à l'interaction avec les récepteurs FcγRIIa et FcγRIIb n'a pu être évaluée, car les cinétiques sont trop rapides. Il serait donc intéressant de diminuer la température lors de l'expérience afin de ralentir les cinétiques et vérifier s'il est possible de différencier les différents patrons de glycosylation des AcMs étudiés.

L'utilisation de la technologie employant la capture par les simples brins d'ADN est coûteuse. Il serait intéressant d'évaluer l'application des peptides Ecoil/Kcoil pour capturer les récepteurs. Ces peptides ont été largement étudiés dans notre laboratoire et leur interaction est très stable. De plus, nous sommes capables de les produire au laboratoire, ce qui diminuerait les coûts pour chacun des essais SPR.

### Application de la méthodologie SPR

Il serait fort intéressant d'appliquer la méthodologie SPR à d'autres récepteurs, comme le récepteur néonatal (FcRn). Il a été démontré qu'une augmentation de l'affinité de l'IgG pour le FcRn permet d'augmenter la demi-vie de l'anticorps et son efficacité (Abdiche et al., 2015).

La caractérisation des anticorps produits directement dans le milieu de culture n'a pu être faite qu'avec FcγRI. Une alternative intéressante afin de permettre l'utilisation des récepteurs de faible affinité serait de faire interagir les AcMs produits avec leur antigène. La génération d'un complexe immun permet d'augmenter la concentration locale du AcM près de la surface du biocapteur, une fois injecté. Cette augmentation de la concentration locale augmentera l'affinité apparente du AcM

pour FcγRIIIa<sub>F158</sub>, ce qui donnera la possibilité d'évaluer les profils de glycosylation à même le milieu de culture.

Il pourrait aussi être envisagé d'inverser l'orientation de l'essai, c'est-à-dire d'immobiliser l'antigène à la surface du biocapteur. Cette stratégie est avantageuse, car cette interaction est de grande affinité et ne dépend pas de la glycosylation. Il serait donc possible d'évaluer l'impact de la glycosylation des anticorps puisque l'essai serait applicable au récepteur FcγRIIIa<sub>F158</sub> (avec l'orientation actuelle, les récepteurs de faible affinité n'ont pu être utilisés). Dans le cadre de cette thèse, les rendements de production des récepteurs étaient trop bas pour envisager cette orientation, puisqu'il aurait fallu injecter de grandes concentration de récepteurs.

De plus, cet essai pourrait être appliqué « en ligne », directement couplé au bioréacteur. Cela serait particulièrement intéressant lors du développement d'un nouveau procédé. En fait, si l'on veut modifier un paramètre de culture, il serait possible de voir « quasi instantanément » l'effet qu'a le paramètre sur l'anticorps produit.

Finalement, d'autres produits biologiques pourraient être analysés avec cet essai. Il serait intéressant d'adapter l'approche SPR pour les vecteurs viraux (ex. *virus like particles*-VLP) qui présentent des glycans à leur surface. Ces vecteurs viraux sont utilisés notamment pour le développement de vaccins et en immuno-oncologie pour la livraison ciblée de médicament.

## BIBLIOGRAPHIE

Aalberse, R.C., Stapel, S.O., Schuurman, J., Rispens, T., (2009) Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 39, 469-477.

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., (2007) *Basic Immunology*. Elsevier - Health Sciences Division.

Abdiche, Y.N., Yeung, Y.A., Chaparro-Riggers, J., Barman, I., Strop, P., Chin, S.M., Pham, A., Bolton, G., McDonough, D., Lindquist, K., Pons, J., Rajpal, A., (2015) The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs* 7, 331-343.

Aghamohseni, H., Ohadi, K., Spearman, M., Krahn, N., Moo-Young, M., Scharer, J.M., Butler, M., Budman, H.M., (2014) Effects of nutrient levels and average culture pH on the glycosylation pattern of camelid-humanized monoclonal antibody. *J Biotechnol* 186, 98-109.

Al-Rubeai, M., (2011) *Antibody Expression and Production*. Springer Netherlands.

Altschuch, D., Ricard-Blum, S., Ball, V., Gaillet, P., Schaaf, P., Senger, B., Desbat, B., Laval, P., Legrand, J.-F., (2009) *Biosensors Based on Surface Plasmon Resonance: Interpreting the Data*. Nanoscience - Nanobiotechnology and Nanobiology. Springer - Verlag, pp. 477-500.

Altschuh, D., Dubs, M.C., Weiss, E., Zeder-Lutz, G., Van Regenmortel, M.H., (1992) Determination of kinetic constants for the interaction between a monoclonal antibody and peptides using surface plasmon resonance. *Biochemistry* 31, 6298-6304.

An, Z., (2011) *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*. John Wiley & Sons.

Andersen, D.C., Goochee, C.F., (1994) The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins. *Curr Opin Biotechnol* 5, 546-549.



Anthony, R.M., Nimmerjahn, F., Ashline, D.J., Reinhold, V.N., Paulson, J.C., Ravetch, J.V., (2008) Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* 320, 373-376.

Anthony, R.M., Ravetch, J.V., (2010) A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1, S9-14.

Anumula, K.R., (2012) Quantitative glycan profiling of normal human plasma derived immunoglobulin and its fragments Fab and Fc. *J Immunol Methods* 382, 167-176.

Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., Dwek, R.A., (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25, 21-50.

Asaoka, Y., Hatayama, K., Ide, T., Tsumoto, K., Tomita, M., (2013) The binding of soluble recombinant human Fcγ receptor I for human immunoglobulin G is conferred by its first and second extracellular domains. *Mol Immunol* 54, 403-407.

Baker, K.N., Rendall, M.H., Hills, A.E., Hoare, M., Freedman, R.B., James, D.C., (2001) Metabolic control of recombinant protein N-glycan processing in NS0 and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 73, 188-202.

Bennett, C.L., Luminari, S., Nissenson, A.R., Tallman, M.S., Klinge, S.A., McWilliams, N., McKoy, J.M., Kim, B., Lyons, E.A., Trifilio, S.M., Raisch, D.W., Evens, A.M., Kuzel, T.M., Schumock, G.T., Belknap, S.M., Locatelli, F., Rossert, J., Casadevall, N., (2004) Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N Engl J Med* 351, 1403-1408.

Biacore, (1998) *BIAtchnology Handbook*. Uppsala, Sweden.

Bolland, S., Ravetch, J.V., (2000) Spontaneous autoimmune disease in Fc(γ)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13, 277-285.

Bollati-Fogolin, M., Forno, G., Nimtz, M., Conradt, H.S., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., (2005) Temperature reduction in cultures of hGM-CSF-expressing CHO cells: effect on productivity and product quality. *Biotechnol Prog* 21, 17-21.

Bournazos, S., Woof, J.M., Hart, S.P., Dransfield, I., (2009) Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants. *Clin Exp Immunol* 157, 244-254.

Braakman, I., Helenius, J., Helenius, A., (1992) Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 11, 1717-1722.

Bracke, M., Coffey, P.J., Lammers, J.W., Koenderman, L., (1998) Analysis of signal transduction pathways regulating cytokine-mediated Fc receptor activation on human eosinophils. *J Immunol* 161, 6768-6774.

Brezski, R.J., Almagro, J.C., (2012) Application of Antibody Engineering in the Development of Next Generation Antibody-Based Therapeutics. In: Tabrizi, M.A., Bornstein, G.G., Klakamp, S.C. (Eds.), *Development of Antibody-Based Therapeutics*. Springer-Verlag, New York, pp. 65-93.

Brooks, S.A., (2010) Protein Glycosylation. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, Volumes 1-7*. John Wiley & Sons, pp. 4082-4096.

Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daeron, M., (2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716-3725.

Burleigh, S.C., van de Laar, T., Stroop, C.J.M., van Grunsven, W.M.J., O'Donoghue, N., Rudd, P.M., Davey, G.P., (2011) Synergizing metabolic flux analysis and nucleotide sugar metabolism to understand the control of glycosylation of recombinant protein in CHO cells. 95.

Butler, M., (2005) Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 68, 283-291.

Butler, M., (2006) Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by Mammalian cell systems. *Cytotechnology* 50, 57-76.

Butler, M., Spearman, M., (2014) The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr Opin Biotechnol* 30, 107-112.

Camacho, L.H., Frost, C.P., Abella, E., Morrow, P.K., Whittaker, S., (2014) Biosimilars 101: considerations for U.S. oncologists in clinical practice. *Cancer Med* 3, 889-899.

Casey, J.R., Grinstein, S., Orlowski, J., (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 50-61.

Chavane, N., Jacquemart, R., Hoemann, C.D., Jolicoeur, M., De Crescenzo, G., (2008) At-line quantification of bioactive antibody in bioreactor by surface plasmon resonance using epitope detection. *Anal Biochem* 378, 158-165.

Chee Fung Wong, D., Tin Kam Wong, K., Tang Goh, L., Kiat Heng, C., Gek Sim Yap, M., (2005) Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 89, 164-177.

Chotigeat, W., Watanapokasin, Y., Mahler, S., Gray, P.P., (1994) Role of Environmental-Conditions on the Expression Levels, Glycoform Pattern and Levels of Sialyltransferase for Hfsh Produced by Recombinant Cho Cells. *Cytotechnology* 15, 217-221.

Chu, S.Y., Vostiar, I., Karki, S., Moore, G.L., Lazar, G.A., Pong, E., Joyce, P.F., Szymkowski, D.E., Desjarlais, J.R., (2008) Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies. *Mol Immunol* 45, 3926-3933.

Clark, K.J., Griffiths, J., Bailey, K.M., Harcum, S.W., (2005) Gene-expression profiles for five key glycosylation genes for galactose-fed CHO cells expressing recombinant IL-4/13 cytokine trap. *Biotechnol Bioeng* 90, 568-577.

Clark, K.J.R., Chaplin, F.W.R., Harcum, S.W., (2004) Temperature effects on product-quality-related enzymes in batch CHO cell cultures producing recombinant tPA. *Biotechnol Prog* 20, 1888-1892.

Cohen-Solal, J.F., Cassard, L., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., (2004) Fc gamma receptors. *Immunol Lett* 92, 199-205.

Concetti, F., Napolioni, V., (2010) Insights into the role of Fc gamma receptors (FcgammaRs) genetic variations in monoclonal antibody-based anti-cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 5, 197-204.

Cooper, A., (2004) *Biophysical chemistry*. Royal Society of Chemistry.

Crowell, C.K., Grampp, G.E., Rogers, G.N., Miller, J., Scheinman, R.I., (2007) Amino acid and manganese supplementation modulates the glycosylation state of erythropoietin in a CHO culture system. *Biotechnol Bioeng* 96, 538-549.

Cruz, H.J., Peixoto, C.M., Nimtz, M., Alves, P.M., Dias, E.M., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T., (2000) Metabolic shifts do not influence the glycosylation patterns of a recombinant fusion protein expressed in BHK cells. *Biotechnol Bioeng* 69, 129-139.

Daeron, M., (2014) Fc receptors as adaptive immunoreceptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 382, 131-164.

Davies, J., Jiang, L., Pan, L.Z., LaBarre, M.J., Anderson, D., Reff, M., (2001) Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng* 74, 288-294.

Day, Y.S., Baird, C.L., Rich, R.L., Myszka, D.G., (2002) Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Sci* 11, 1017-1025.

De Crescenzo, G., Boucher, C., Durocher, Y., Jolicoeur, M., (2008) Kinetic Characterization by Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors: Principle and Emerging Trends. *Cellular and Molecular Bioengineering* 1, 204-215.

De Crescenzo, G., Litowski, J.R., Hodges, R.S., O'Connor-McCourt, M.D., (2003) Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils: effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding. *Biochemistry* 42, 1754-1763.

del Val, I.J., Kontoravdi, C., Nagy, J.M., (2010) Towards the implementation of quality by design to the production of therapeutic monoclonal antibodies with desired glycosylation patterns. *Biotechnol Prog* 26, 1505-1527.

Dorion-Thibaudeau, J., Raymond, C., Lattova, E., Perreault, H., Durocher, Y., De Crescenzo, G., (2014) Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J Immunol Methods* 408, 24-34.

Dorion-Thibaudeau, J., St-Laurent, G., Raymond, C., De Crescenzo, G., Durocher, Y., (2016) Biotinylation of the Fc $\gamma$  receptor ectodomains by mammalian cell co-transfection: application to the development of a surface plasmon resonance-based assay. *J Mol Recogn* 29, 60-69.

Drescher, B., Witte, T., Schmidt, R.E., (2003) Glycosylation of Fc gamma RIII in N163 as mechanism of regulating receptor affinity. *Immunology* 110, 335-340.

Dundas, C., Demonte, D., Park, S., (2013) Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 9343-9353.

Durocher, Y., Butler, M., (2009) Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 20, 700-707.

Ecker, D.M., Jones, S.D., Levine, H.L., (2015) The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* 7, 9-14.

Edberg, J.C., Kimberly, R.P., (1997) Cell type-specific glycoforms of Fc gamma RIIIa (CD16) - Differential ligand binding. *J Immunol* 159, 3849-3857.

Edberg, J.C., Salmon, J.E., Kimberly, R.P., (1992) Functional capacity of Fc gamma receptor III (CD16) on human neutrophils. *Immunol Res* 11, 239-251.

Elvin, J.G., Couston, R.G., van der Walle, C.F., (2013) Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* 440, 83-98.

Engvall, E., Perlmann, P., (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.

Ernst, L.K., Metes, D., Herberman, R.B., Morel, P.A., (2002) Allelic polymorphisms in the FcgammaRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells. *J Mol Med (Berl)* 80, 248-257.

Espy, C., Morelle, W., Kavian, N., Grange, P., Goulvestre, C., Viallon, V., Chereau, C., Pagnoux, C., Michalski, J.C., Guillevin, L., Weill, B., Batteux, F., Guilpain, P., (2011) Sialylation levels of anti-proteinase 3 antibodies are associated with the activity of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's). *Arthritis Rheum* 63, 2105-2115.

Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Muller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S.K., Kontoravdi, C., Weilguny, D., Andersen, M.R., (2015) Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnol Bioeng* 112, 521-535.

Feige, M.J., Hendershot, L.M., (2011) Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Curr Opin Cell Biol* 23, 167-175.

Ferrante, A., Beard, L.J., Feldman, R.G., (1990) IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J* 9, S16-24.

Ferrara, C., Brunner, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., Umana, P., (2006a) Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng* 93, 851-861.

Ferrara, C., Grau, S., Jager, C., Sondermann, P., Brunner, P., Waldhauer, I., Hennig, M., Ruf, A., Rufer, A.C., Stihle, M., Umana, P., Benz, J., (2011) Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between Fc gammaRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12669-12674.

Ferrara, C., Stuart, F., Sondermann, P., Brunner, P., Umana, P., (2006b) The carbohydrate at Fc gammaRIIIa Asn-162 - an element required for high affinity binding to non-fucosylated IgG glycoforms. *J Biol Chem* 281, 5032-5036.

Forthal, D.N., (2014) Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr* 2, AID-0019-2014.

Gabius, H.J., (2009) *The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences*. Wiley.

Galon, J., Robertson, M.W., Galinha, A., Mazieres, N., Spagnoli, R., Fridman, W.H., Sautes, C., (1997) Affinity of the interaction between Fc gamma receptor type III (Fc gammaRIII) and monomeric human IgG subclasses. Role of Fc gammaRIII glycosylation. *Eur J Immunol* 27, 1928-1932.

Gavin, A., Hulett, M.D., Hogarth, M.P., (1998) Molecular basis for the interaction of Fc receptors with immunoglobulins. *Immunoglobulin Receptors and their physiological and pathological roles in immunity*. Kluwer Academic Publishers, New-York, pp. Part A-2.

Gawlitsek, M., Estacio, M., Furch, T., Kiss, R., (2009) Identification of cell culture conditions to control N-glycosylation site-occupancy of recombinant glycoproteins expressed in CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 103, 1164-1175.

Gawlitsek, M., Valley, U., Wagner, R., (1998) Ammonium ion and glucosamine dependent increases of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnol Bioeng* 57, 518-528.

Geigert, J., (2004) *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals*, New-York.

Georgen, J.-L., Guedon, E., Clincke, M.-F., (2011) *Procédés de production des protéines recombinantes : vers une maîtrise de la glycosylation*. Techniques de l'ingénieur, Paris.

Ghirlando, R., Keown, M.B., Mackay, G.A., Lewis, M.S., Unkeless, J.C., Gould, H.J., (1995) Stoichiometry and thermodynamics of the interaction between the fc fragment of human igh(1) and its low-affinity receptor fc-gamma-riii. *Biochemistry* 34, 13320-13327.

Glaser, R.W., (1993) Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics. *Analytical biochemistry* 213, 152-161.

Goldstein, B., Coombs, D., He, X., Pineda, A.R., Wofsy, C., (1999) The influence of transport on the kinetics of binding to surface receptors: application to cells and BIAcore. *J Mol Recogn* 12, 293-299.

Goudjdami, D., Lahrichi, M., Skouri, M., (2002) *Optique géométrique - Loi de Snell-Descartes*. Université du Québec à Montréal, Montreal.

Groselj-Grenc, M., Ihan, A., Derganc, M., (2008) Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes. *Mediators Inflamm* 2008, 202646.



Gross, J.H., (2011) *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer.

Gu, X., Wang, D.I., (1998) Improvement of interferon-gamma sialylation in Chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnol Bioeng* 58, 642-648.

Ha, S., Ou, Y., Vlasak, J., Li, Y., Wang, S., Vo, K., Du, Y., Mach, A., Fang, Y., Zhang, N., (2011) Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology* 21, 1087-1096.

Hanisch, F.G., (2012) O-glycoproteomics: site-specific O-glycoprotein analysis by CID/ETD electrospray ionization tandem mass spectrometry and top-down glycoprotein sequencing by in-source decay MALDI mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 842, 179-189.

Hanson, Q.M., Barb, A.W., (2015) A perspective on the structure and receptor binding properties of immunoglobulin G Fc. *Biochemistry* 54, 2931-2942.

Hayes, J.M., Frostell, A., Cosgrave, E.F., Struwe, W.B., Potter, O., Davey, G.P., Karlsson, R., Anneren, C., Rudd, P.M., (2014) Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: a requirement for stable antibody interactions. *J Proteome Res* 13, 5471-5485.

Hayter, P.M., Curling, E.M.A., Baines, A.J., Jenkins, N., Salmon, I., Strange, P.G., Tong, J.M., Bull, A.T., (1992) Glucose-Limited Chemostat Culture of Chinese-Hamster Ovary Cells Producing Recombinant Human Interferon-Gamma. *Biotechnol Bioeng* 39, 327-335.

Healthcare, G., (2012) *Sensor Chip Surface Handbook*.

Heijnen, I.A., van de Winkel, J.G., (1997) Human IgG Fc receptors. *Int Rev Immunol* 16, 29-55.

Hendrickson, T.L., Imperiali, B., (1995) Metal-Ion Dependence of Oligosaccharyl Transferase - Implications for Catalysis. *Biochemistry* 34, 9444-9450.

Hills, A.E., Patel, A., Boyd, P., James, D.C., (2001) Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng* 75, 239-251.

Hogarth, P.M., Pietersz, G.A., (2012) Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 11, 311-331.

Hokke, C.H., Bergwerff, A.A., Van Dedem, G.W., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F., (1995) Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetylactosamine units. *Eur J Biochem* 228, 981-1008.

Holland, M., Yagi, H., Takahashi, N., Kato, K., Savage, C.O., Goodall, D.M., Jefferis, R., (2006) Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis. *Biochim Biophys Acta* 1760, 669-677.

Hossler, P., Khattak, S.F., Li, Z.J., (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19, 936-949.

Houde, D., Peng, Y., Berkowitz, S.A., Engen, J.R., (2010) Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *MCP* 9, 1716-1728.

Huhn, C., Selman, M.H., Ruhaak, L.R., Deelder, A.M., Wuhler, M., (2009) IgG glycosylation analysis. *J Proteomics* 9, 882-913.

Hulett, M.D., Hogarth, P.M., (1994) Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* 57, 1-127.

Hulett, M.D., Hogarth, P.M., (1998) The second and third extracellular domains of Fc gamma RI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol* 35, 989-996.

Ivarsson, M., Villiger, T.K., Morbidelli, M., Soos, M., (2014) Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *J Biotechnol* 188C, 88-96.

Jefferis, R., (1993) The glycosylation of antibody molecules: functional significance. *Glycoconj J* 10, 358-361.

Jefferis, R., (2005) Glycosylation of natural and recombinant antibody molecules. *Glycobiology and Medicine*, pp. 143-148.

Jefferis, R., Lund, J., Goodall, M., (1995) Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation. *Immunol Lett* 44, 111-117.

Jefferis, R., Lund, J., Pound, J.D., (1998) IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev* 163, 59-76.

Jenkins, N., Parekh, R.B., James, D.C., (1996) Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat Biotechnol* 14, 975-981.

Jouvin, M.H., Adamczewski, M., Numerof, R., Letourneur, O., Valle, A., Kinet, J.P., (1994) Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J Biol Chem* 269, 5918-5925.

Kanda, Y., Yamada, T., Mori, K., Okazaki, A., Inoue, M., Kitajima-Miyama, K., Kuni-Kamochi, R., Nakano, R., Yano, K., Kakita, S., Shitara, K., Satoh, M., (2007) Comparison of biological activity among nonfucosylated therapeutic IgG1 antibodies with three different N-linked Fc oligosaccharides: the high-mannose, hybrid, and complex types. *Glycobiology* 17, 104-118.

Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670-673.

Karlsson, R., (2004) SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J Mol Recognit* 17, 151-161.

Kato, K., Sautès-Fridman, C., Yamada, W., Kobayashi, K., Uchiyama, S., Kim, H., Enokizono, J., Galinha, A., Kobayashi, Y., Fridman, W.H., Arata, Y., Shimada, I., (2000) Structural basis of the interaction between IgG and fc[gamma] receptors. *J Mol Biol* 295, 213-224.

Kaufman, R.J., Swaroop, M., Murthariel, P., (1994) Depletion of Manganese within the Secretory Pathway Inhibits O-Linked Glycosylation in Mammalian-Cells. *Biochemistry* 33, 9813-9819.

Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M., Bailey, J.E., (1999) Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 63, 573-582.

Khawli, L.A., Goswami, S., Hutchinson, R., Kwong, Z.W., Yang, J., Wang, X., Yao, Z., Sreedhara, A., Cano, T., Tesar, D., Nijem, I., Allison, D.E., Wong, P.Y., Kao, Y.H., Quan, C., Joshi, A., Harris, R.J., Motchnik, P., (2010) Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats. *MAbs* 2, 613-624.

Kim, J., Kim, Y.-G., Lee, G., (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 917-930.

Kiyoshi, M., Caaveiro, J.M., Kawai, T., Tashiro, S., Ide, T., Asaoka, Y., Hatayama, K., Tsumoto, K., (2015) Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat Commun* 6, 6866.

Kornfeld, R., Kornfeld, S., (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54, 631-664.

Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., Sondermann, P., (2003) Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J Mol Biol* 325, 979-989.

Kunkel, J.P., Jan, D.C.H., Jamieson, J.C., Butler, M., (1998) Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody. *J Biotechnol* 62, 55-71.

Li, J., Zhu, Z., (2010) Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. *Acta Pharmacol Sin* 31, 1198-1207.

- Li, P., Jiang, N., Nagarajan, S., Wohlhueter, R., Selvaraj, P., Zhu, C., (2007) Affinity and kinetic analysis of Fcγ receptor IIIa (CD16a) binding to IgG ligands. *J Biol Chem* 282, 6210-6221.
- Lin, A.A., Kimura, R., Miller, W.M., (1993) Production of Tpa in Recombinant Cho Cells under Oxygen-Limited Conditions. *Biotechnol Bioeng* 42, 339-350.
- Lin, C.W., Tsai, M.H., Li, S.T., Tsai, T.I., Chu, K.C., Liu, Y.C., Lai, M.Y., Wu, C.Y., Tseng, Y.C., Shivatare, S.S., Wang, C.H., Chao, P., Wang, S.Y., Shih, H.W., Zeng, Y.F., You, T.H., Liao, J.Y., Tu, Y.C., Lin, Y.S., Chuang, H.Y., Chen, C.L., Tsai, C.S., Huang, C.C., Lin, N.H., Ma, C., Wu, C.Y., Wong, C.H., (2015) A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10611-10616.
- Little, M., Kipriyanov, S.M., Le Gall, F., Moldenhauer, G., (2000) Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. *Immunol Today* 21, 364-370.
- Liu, J.K.H., (2014) The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg* 3, 113-116.
- Lu, J., Chu, J., Zou, Z., Hamacher, N.B., Rixon, M.W., Sun, P.D., (2015) Structure of FcγRI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 833-838.
- Lu, J., Ellsworth, J.L., Hamacher, N., Oak, S.W., Sun, P.D., (2011) Crystal structure of Fcγ receptor I and its implication in high affinity gamma-immunoglobulin binding. *J Biol Chem* 286, 40608-40613.
- Lund, J., Tanaka, T., Takahashi, N., Sarmay, G., Arata, Y., Jefferis, R., (1990) A Protein Structural-Change in Aglycosylated IgG3 Correlates with Loss of Hufc-Gamma-R1 and Hufc-Gamma-R111 Binding and or Activation. *Mol Immunol* 27, 1145-1153.

Luo, Y., Lu, Z., Raso, S.W., Entrican, C., Tangarone, B., (2009) Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fcγ receptors. *Mabs* 1, 491-504.

Maenaka, K., van der Merwe, P.A., Stuart, D.I., Jones, E.Y., Sondermann, P., (2001) The human low affinity Fcγ receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem* 276, 44898-44904.

Mahmood, T., Yang, P.-C., (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci* 4, 429-434.

Male, D.K., Roitt, Y., (2007) *Immunologie*. Elsevier Masson.

Miclet, E., Bourgoïn-Voillard, S., Byrne, C., Jacquot, Y., (2016) Application of Circular Dichroism Spectroscopy to the Analysis of the Interaction Between the Estrogen Receptor Alpha and Coactivators: The Case of Calmodulin. *Methods Mol Biol* 1366, 241-259.

Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S.P., Goodall, M., Jefferis, R., (2001) Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc γ<sub>1</sub>RIIb binding. *Journal of Biological Chemistry* 276, 45539-45547.

Myszka, D.G., (1999) Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12, 279-284.

Myszka, D.G., Morton, T.A., Doyle, M.L., Chaiken, I.M., (1997) Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor. *Biophysical chemistry* 64, 127-137.

Naso, M.F., Tam, S.H., Scallon, B.J., Raju, T.S., (2010) Engineering host cell lines to reduce terminal sialylation of secreted antibodies. *MAbs* 2, 519-527.

Nimmerjahn, F., Anthony, R.M., Ravetch, J.V., (2007) Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8433-8437.

Nyberg, G.B., Balcarcel, R.R., Follstad, B.D., Stephanopoulos, G., Wang, D.I.C., (1999) Metabolic effects on recombinant interferon-gamma glycosylation in continuous culture of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 62, 336-347.

Okazaki, A., Shoji-Hosaka, E., Nakamura, K., Wakitani, M., Uchida, K., Kakita, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Shitara, K., (2004) Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J Mol Biol* 336, 1239-1249.

Ongay, S., Puerta, A., Diez-Masa, J.C., Bergquist, J., de Frutos, M., (2009) CIEF and MALDI-TOF-MS methods for analyzing forms of the glycoprotein VEGF 165. *Electrophoresis* 30, 1198-1205.

Paetz, A., Sack, M., Thepen, T., Tur, M.K., Bruell, D., Finnern, R., Fischer, R., Barth, S., (2005) Recombinant soluble human Fcγ receptor I with picomolar affinity for immunoglobulin G. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1811-1817.

Parekh, R.B., Dwek, R.A., Sutton, B.J., Fernandes, D.L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T.W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., et al., (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316, 452-457.

Parham, P., Masson, P., (2003) *Le système immunitaire*. De Boeck.

Patel, R., Johnson, K.K., Adrien, B.A., Tamburini, P.P., (2013) IgG subclass variation of a monoclonal antibody binding to human Fc-γ receptors. *Am J Biochem Biotechnol* 9, 206-218.

Patel, T.P., Parekh, R.B., Moellering, B.J., Prior, C.P., (1992) Different Culture Methods Lead to Differences in Glycosylation of a Murine IgG Monoclonal-Antibody. *Biochem J* 285, 839-845.

Paul, W.E., (2012) *Fundamental Immunology*, 7th ed. Wolters Kluwer Health.

Phillips, N.E., Parker, D.C., (1983) Fc-dependent inhibition of mouse B cell activation by whole anti-mu antibodies. *J Immunol* 130, 602-606.

Pignata, C., Prasad, K.V., Robertson, M.J., Levine, H., Rudd, C.E., Ritz, J., (1993) Fc gamma RIIIA-mediated signaling involves src-family lck in human natural killer cells. *J Immunol* 151, 6794-6800.

Pincetic, A., Bournazos, S., DiLillo, D.J., Maamary, J., Wang, T.T., Dahan, R., Fiebiger, B.M., Ravetch, J.V., (2014) Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 15, 707-716.

Pol, E., Karlsson, R., Roos, H., Jansson, Å., Xu, B., Larsson, A., Jarhede, T., Franklin, G., Fuentes, A., Persson, S., (2007) Biosensor-based characterization of serum antibodies during development of an anti-IgE immunotherapeutic against allergy and asthma. *Journal of Molecular Recognition* 20, 22-31.

Powell, M.S., Hogarth, P.M., (2008) Fc Receptors. *Multichain Immune Recognition Receptor Signaling: From Spatiotemporal Organization to Human Disease*. Springer-Verlag Berlin, Berlin, pp. 24-34.

Prakrankamanant, P., (2014) Quartz crystal microbalance biosensors: prospects for point-of-care diagnostics. *J Med Assoc Thai* 97 Suppl 4, S56-64.

Radaev, S., Sun, P., (2002) Recognition of immunoglobulins by Fc[gamma] receptors. *Mol Immunol* 38, 1073-1083.

Radaev, S., Sun, P.D., (2001) Recognition of IgG by Fcgamma receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem* 276, 16478-16483.

Rademacher, T.W., Williams, P., Dwek, R.A., (1994) Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6123-6127.



Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M., Jones, A.J., (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* 10, 477-486.

Ravetch, J., (2010) In vivo veritas: the surprising roles of Fc receptors in immunity. *Nat Immunol* 11, 183-185.

Raymond, C., Robotham, A., Spearman, M., Butler, M., Kelly, J., Durocher, Y., (2015) Production of alpha2,6-sialylated IgG1 in CHO cells. *MAbs*, 0.

Restelli, V., Wang, M.D., Huzel, N., Ethier, M., Perreault, H., Butler, M., (2006) The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 94, 481-494.

Ribatti, D., (2014) From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal. *Immunol Lett* 161, 96-99.

Rich, R.L., Myszka, D.G., (2000) Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* 11, 54-61.

Richalet-Sécordel, P.M., Rauffer-Bruyère, N., Christensen, L.L.H., Ofenloch-Haehnle, B., Seidel, C., Van Regenmortel, M.H.V., (1997) Concentration Measurement of Unpurified Proteins Using Biosensor Technology under Conditions of Partial Mass Transport Limitation. *Anal Biochem* 249, 165-173.

Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., Desjarlais, J.R., (2008) Optimization of antibody binding to FcgammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 7, 2517-2527.

Sanchez-Mejorada, G., Rosales, C., (1998) Fcgamma receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J Biol Chem* 273, 27610-27619.

SantéCanada, (2010) Exigences en matière de renseignements et de présentation relative aux produits biologiques ultérieurs. Canada.

Sarah, W.H., (2005) Protein Glycosylation. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies. CRC Press, pp. 113-153.

Scallon, B., McCarthy, S., Radewonuk, J., Cai, A., Naso, M., Raju, T.S., Capocasale, R., (2007a) Quantitative in vivo comparisons of the Fc gamma receptor-dependent agonist activities of different fucosylation variants of an immunoglobulin G antibody. *Int Immunopharmacol* 7, 761-772.

Scallon, B.J., Tam, S.H., McCarthy, S.G., Cai, A.N., Raju, T.S., (2007b) Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol* 44, 1524-1534.

Schaap, M.C., Guimaraes, A.M., Wilderspin, A.F., Wells, G., (2016) Protocol for a Steady-State FRET Assay in Cancer Chemoprevention. *Methods Mol Biol* 1379, 165-179.

Schasfoort, R.B.M., Tudos, A.J., (2008) Handbook Of Surface Plasmon Resonance. Royal Society of Chemistry.

Scherer, H.U., van der Woude, D., Ioan-Facsinay, A., el Bannoudi, H., Trouw, L.A., Wang, J., Haupl, T., Burmester, G.R., Deelder, A.M., Huizinga, T.W., Wuhler, M., Toes, R.E., (2010) Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid. *Arthritis Rheum* 62, 1620-1629.

Schiff, D.E., Rae, J., Martin, T.R., Davis, B.H., Curnutte, J.T., (1997) Increased phagocyte Fc gammaRI expression and improved Fc gamma-receptor-mediated phagocytosis after in vivo recombinant human interferon-gamma treatment of normal human subjects. *Blood* 90, 3187-3194.

Selman, M.H., de Jong, S.E., Soonawala, D., Kroon, F.P., Adegnika, A.A., Deelder, A.M., Hokke, C.H., Yazdanbakhsh, M., Wuhler, M., (2012) Changes in antigen-specific IgG1 Fc N-glycosylation upon influenza and tetanus vaccination. *Mol Cell Proteomics* 11, M111 014563.

Selvaraj, P., Carpen, O., Hibbs, M.L., Springer, T.A., (1989) Natural killer cell and granulocyte Fc gamma receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction. *J Immunol* 143, 3283-3288.

Serrato, J.A., Hernandez, V., Estrada-Mondaca, S., Palomares, L.A., Ramirez, O.T., (2007) Differences in the glycosylation profile of a monoclonal antibody produced by hybridomas cultured in serum-supplemented, serum-free or chemically defined media. *Biotechnol Appl Biochem* 47, 113-124.

Shibata-Koyama, M., Iida, S., Okazaki, A., Mori, K., Kitajima-Miyama, K., Saitou, S., Kakita, S., Kanda, Y., Shitara, K., Kato, K., Satoh, M., (2009) The N-linked oligosaccharide at Fc gamma RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fc gamma RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *Glycobiology* 19, 126-134.

Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., Presta, L.G., (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277, 26733-26740.

Shikata, K., Yasuda, T., Takeuchi, F., Konishi, T., Nakata, M., Mizuochi, T., (1998) Structural changes in the oligosaccharide moiety of human IgG with aging. *Glycoconj J* 15, 683-689.

Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., Shitara, K., (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278, 3466-3473.

Shire, S.J., Gombotz, W., Bechtold-Peters, K., Andya, J., (2010) *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*. Springer New York.

Shuptrine, C.W., Surana, R., Weiner, L.M., (2012) Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 22, 3-13.

Siber, G.R., Schur, P.H., Aisenberg, A.C., Weitzman, S.A., Schiffman, G., (1980) Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med* 303, 178-182.

Siberil, S., Dutertre, C.A., Boix, C., Bonnin, E., Menez, R., Stura, E., Jorieux, S., Fridman, W.H., Teillaud, J.L., (2006) Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett* 106, 111-118.

Sondermann, P., Huber, R., Jacob, U., (1999a) Crystal structure of the soluble form of the human fcγ-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J* 18, 1095-1103.

Sondermann, P., Jacob, U., (1999) Human Fcγ receptor IIb expressed in *Escherichia coli* reveals IgG binding capability. *Biol Chem* 380, 717-721.

Sondermann, P., Jacob, U., Kutscher, C., Frey, J., (1999b) Characterization and crystallization of soluble human Fc γ receptor II (CD32) isoforms produced in insect cells. *Biochemistry* 38, 8469-8477.

Sondermann, P., Kaiser, J., Jacob, U., (2001) Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol* 309, 737-749.

Sondermann, P., Pincetic, A., Maamary, J., Lammens, K., Ravetch, J.V., (2013) General mechanism for modulating immunoglobulin effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9868-9872.

Spearman, M., Dionne, B., Butler, B., (2011) Chapter 12: The Role of Glycosylation in Therapeutic Antibodies. Antibody Expression and Production. Springer.

Spellman, M.W., (1990) Carbohydrate characterization of recombinant glycoproteins of pharmaceutical interest. Anal Chem 62, 1714-1722.

Swanson, J.A., Hoppe, A.D., (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. J Leukoc Biol 76, 1093-1103.

Tachibana, H., Jiyoun, K., Taniguchi, K., Ushio, Y., Teruya, K., Osada, K., Inoue, Y., Shirahata, S., Murakami, H., (1996) Modified antigen-binding of human antibodies with glycosylation variations of the light chains produced in sugar-limited human hybridoma cultures. In Vitro Cell Dev Biol Anim 32, 178-183.

Udpa, N., Million, R.P., (2016) Monoclonal antibody biosimilars. Nat Rev Drug Discov 15, 13-14.

Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H., Bailey, J.E., (1999) Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. Nat Biotechnol 17, 176-180.

Valley, U., Nimtz, M., Conradt, H.S., Wagner, R., (1999) Incorporation of ammonium into intracellular UDP-activated N-acetylhexosamines and into carbohydrate structures in glycoproteins. Biotechnol Bioeng 64, 401-417.

van de Geijn, F.E., Wuhler, M., Selman, M.H., Willemsen, S.P., de Man, Y.A., Deelder, A.M., Hazes, J.M., Dolhain, R.J., (2009) Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. Arthritis Res Ther 11, R193.

van der Merwe, P.A., (2003) Surface Plasmon Resonance.

Van Regenmortel, M.H., Choulier, L., (2001) Recognition of peptides by antibodies and investigations of affinity using biosensor technology. *Comb Chem High Throughput Screen* 4, 385-395.

Vance, B.A., Huizinga, T.W.J., Guyre, P.M., (1992) Functional Polymorphism of Fc-Gamma-Riii on Human Lgl/Nk Cells. *Faseb Journal* 6, A1217-A1217.

Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispen, T., (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520.

Villacrés, C., Tayi, V.S., Lattová, E., Perreault, H., Butler, M., (2015) Low glucose depletes glycan precursors, reduces site occupancy and galactosylation of a monoclonal antibody in CHO cell culture. *Biotechnol J* 10, 1051-1066.

Voiculescu, I., Nordin, A.N., (2012) Acoustic wave based MEMS devices for biosensing applications. *Biosens Bioelectron* 33, 1-9.

Voynov, V., Chennamsetty, N., Kayser, V., Helk, B., Forrer, K., Zhang, H., Fritsch, C., Heine, H., Trout, B.L., (2009) Dynamic fluctuations of protein-carbohydrate interactions promote protein aggregation. *PLoS One* 4, e8425.

Waldman, B.C., Rudnick, G., (1990) UDP-GlcNAc transport across the Golgi membrane: electroneutral exchange for dianionic UMP. *Biochemistry* 29, 44-52.

Walker, J.M., Rapley, R., (2008) *Molecular biomethods handbook*. Humana Press.

Walker, M.R., Lund, J., Thompson, K.M., Jefferis, R., (1989) Aglycosylation of human IgG1 and IgG3 monoclonal antibodies can eliminate recognition by human cells expressing Fc gamma RI and/or Fc gamma RII receptors. *Biochem J* 259, 347-353.

Wang, T.T., Maamary, J., Tan, G.S., Bournazos, S., Davis, C.W., Krammer, F., Schlesinger, S.J., Palese, P., Ahmed, R., Ravetch, J.V., (2015) Anti-HA Glycoforms Drive B Cell Affinity Selection and Determine Influenza Vaccine Efficacy. *Cell* 162, 160-169.

Warmerdam, P.A., Nabben, N.M., van de Graaf, S.A., van de Winkel, J.G., Capel, P.J., (1993) The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem* 268, 7346-7349.

Weiner, G.J., (2015) Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer* 15, 361-370.

Wong, D.C.F., Wong, K.T.K., Goh, L.T., Heng, C.K., Yap, M.G.S., (2005) Impact of dynamic online fed-batch strategies on metabolism, productivity and N-glycosylation quality in CHO cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 89, 164-177.

Woof, J.M., Burton, D.R., (2004) Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol* 4, 89-99.

Wormald, M.R., Rudd, P.M., Harvey, D.J., Chang, S.C., Scragg, I.G., Dwek, R.A., (1997) Variations in oligosaccharide-protein interactions in immunoglobulin G determine the site-specific glycosylation profiles and modulate the dynamic motion of the Fc oligosaccharides. *Biochemistry* 36, 1370-1380.

Wuhrer, M., Stam, J.C., van de Geijn, F.E., Koeleman, C.A., Verrips, C.T., Dolhain, R.J., Hokke, C.H., Deelder, A.M., (2007) Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum. *J Proteomics* 7, 4070-4081.

Yamada, E., Tsukamoto, Y., Sasaki, R., Yagyu, K., Takahashi, N., (1997) Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconj J* 14, 401-405.

Yamada, K., Hyodo, S., Kinoshita, M., Hayakawa, T., Kakehi, K., (2010) Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. *Anal Chem* 82, 7436-7443.

Yang, M., Butler, M., (2000) Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol Prog* 16, 751-759.

Yoo, E.M., Morrison, S.L., (2010) Antibody Engineering. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, Volumes 1-7*. John Wiley & Sons, pp. 332-343.

Yoon, S.K., Choi, S.L., Song, J.Y., Lee, G.M., (2005) Effect of culture pH on erythropoietin production by chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnol Bioeng* 89, 345-356.

Yu, X., Baruah, K., Harvey, D.J., Vasiljevic, S., Alonzi, D.S., Song, B.D., Higgins, M.K., Bowden, T.A., Scanlan, C.N., Crispin, M., (2013) Engineering hydrophobic protein-carbohydrate interactions to fine-tune monoclonal antibodies. *J Am Chem Soc* 135, 9723-9732.

Zeck, A., Pohlentz, G., Schlothauer, T., Peter-Katalinic, J., Regula, J.T., (2011) Cell type-specific and site directed N-glycosylation pattern of FcγRIIIa. *J Proteome Res* 10, 3031-3039.

Zhang, Y., Boesen, C.C., Radaev, S., Brooks, A.G., Fridman, W.H., Sautes-Fridman, C., Sun, P.D., (2000) Crystal structure of the extracellular domain of a human Fc γRIII. *Immunity* 13, 387-395.

Zhou, M.J., Brown, E.J., (1994) CR3 (Mac-1, αMβ2, CD11b/CD18) and Fc γRIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc γRIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol* 125, 1407-1416.

Zou, G., Ochiai, H., Huang, W., Yang, Q., Li, C., Wang, L.X., (2011) Chemoenzymatic synthesis and Fcγ receptor binding of homogeneous glycoforms of antibody Fc domain. Presence of a



bisecting sugar moiety enhances the affinity of Fc to FcγRIIIa receptor. J Am Chem Soc 133, 18975-18991.